



## **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

# **Caracterización fenotípica y molecular de construcciones transgénicas de sobreexpresión del gen *FLK* de *Arabidopsis thaliana***

Memoria de Trabajo de Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Febrero de 2019

**Autor: Víctor José Sobrino Bastán**

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Antonio Vera Tornel

Encarnación Rodríguez Cazorla

Departamento de Biología Aplicada (Área de Genética)

## Resumen y palabras claves

### Resumen:

Para lograr el éxito reproductivo, las plantas deben culminar el proceso de floración. Esto es crucial para la propia planta, el ecosistema y la producción agrícola. *FLK* es una proteína KH de unión a RNA que regula la transición floral al reprimir al inhibidor de la floración *FLC*. El objetivo de este estudio es obtener plantas con una construcción del gen *FLK* bajo la dirección del promotor constitutivo 35S para evaluar el efecto de su sobreexpresión. Analizaremos sus efectos en el tiempo de floración, niveles de expresión del propio gen *FLK* y de otros reguladores de la floración como *FLC*, así como el potencial rescate funcional del mutante *flk*.

**Palabras clave:** Arabidopsis, *FLK*, 35S, Sobreexpresión, Tiempo de floración

### Summary

To achieve reproductive success, plants must culminate the flowering process. This is fundamental for plant reproduction, at the ecological and agricultural levels. *FLK* is a KH-type RNA binding protein that favors the floral transition by repressing the blooming inhibitor *FLC*. The aim of this study is to obtain *FLK*-overexpressing plants under the direction of the 35S constitutive promoter. We will analyze the effects of the overexpressor plants, including flowering time, *FLK* and *FLC* expression levels, together with phenotypical rescue of the *flk* mutant.

**Keywords:** Arabidopsis, *FLK*, 35S, overexpression, Flowering time.

## INDICE

### Contenido

Resumen y palabras claves.....	2
Resumen:.....	2
Palabras clave: .....	2
Summary.....	2
Keywords .....	2
1.INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo .....	5
1.2. Regulación de la floración .....	6
1.3.Vía autónoma de la floración. ....	7
1.4.Integración de las señales inductoras de la floración .....	8
1.5. El promotor 35S: .....	8
2.ANTECEDENTES .....	9
3.OBJETIVOS .....	10
4.MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
4.1. Abreviaturas.....	11
4.2. Organismos utilizados.....	11
4.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
4.2.1.I Proceso de esterilización de semillas .....	12
4.2.1.II Cultivos en placas de Petri .....	12
4.2.1.III Cultivos en maceta .....	13
4.2.1. IV. Realización de cruzamientos genéticos. ....	14
4.2.1.V. Medida del tiempo de floración.....	14
4.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	14
4.2.2.I. Condiciones de cultivo. ....	15
4.3. Medios de cultivo, disoluciones y tampones .....	15
4.3.1. Medios de cultivo.....	15
4.3.1.I. Medio GM (medio de germinación de <i>Arabidopsis</i> ).....	15
4.3.1.II. Medio mínimo ATM ( <i>Arabidopsis thaliana</i> Medium).....	15
4.3.1. III. Sustrato para el cultivo de <i>Arabidopsis</i> en maceta. ....	16
4.3.1.IV Medio LB (Luria-Bertani medium) con glucosa 0,5%.....	16
4.3.2. Disoluciones y tampones .....	16
4.3.2.I Antibióticos .....	16

4.3.2.II. Solución de infiltración .....	16
4.3.2.III. Tampón de extracción de DNA.....	17
4.3.2.IV Disoluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa.....	17
4.4. Obtención y manipulación de ácidos nucleicos .....	17
4.4.1. Aislamiento de DNA genómico de Arabidopsis .....	17
4.4.2. Aislamiento de RNA total de Arabidopsis.....	18
4.4.3. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado .....	18
4.4.4. Electroforesis en gel de agarosa .....	19
4.5. Síntesis de ácidos nucleicos.....	19
4.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	19
4.5.2. Retrotranscripción .....	20
4.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	20
4.6. Generación de plantas con la construcción 35S::FLK.....	21
4.7. Genotipado .....	22
4.7.1. Genotipado Molecular.....	22
4.7.2 Otros métodos de genotipado .....	22
4.8. Análisis estadístico .....	22
4.8.1 Prueba $\chi^2$ .....	22
4.8.2. Análisis de la varianza (ANOVA).....	22
4.8.3. Análisis estadístico de los experimentos de qPCR.....	23
4.9. Oligonucleótidos empleados.....	23
5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
5.1. Obtención de líneas homocigóticas para la inserción 35S::FLK.....	24
5.3 Verificación de la presencia del cDNA de FLK .....	27
5.4. Ensayos con las líneas de inserción homocigóticas.....	28
5.4.1. Verificación de la presencia de una sola inserción .....	28
5.4.2 Medidas de expresión de los genes FLK y FLC.....	29
5.4.3 Obtención de la combinación <i>flk-2 35S::FLK-13</i> y estudio del tiempo de floración.....	31
7. Bibliografía .....	36

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo

Los organismos modelo son especies ampliamente estudiadas en investigación científica debido a características que las hacen idóneas para su uso en el laboratorio. Entre ellas habitualmente se consideran su pequeño tamaño, sencillez de manejo, fácil propagación y descendencia numerosa que facilite el análisis genético, así como la disponibilidad de numerosos recursos moleculares y bioinformáticos.<sup>1,2</sup>

Los organismos modelo se utilizan con objeto de comprender fenómenos biológicos concretos, con la expectativa de que los avances realizados en el modelo sean extrapolables, total o parcialmente, a organismos de una complejidad superior, o de mayor interés económico, sanitario, etc., obteniendo nuevas perspectivas de estudio.

Esto es posible debido al origen común de todos los organismos vivos y la conservación de su material genético, así como de las vías de regulación y desarrollo a través del curso evolutivo.

En el laboratorio del área de Genética del Campus de Sant Joan se emplea *Arabidopsis thaliana*, como organismo modelo de experimentación (a partir de ahora, Arabidopsis).

Arabidopsis es una pequeña planta de la familia de las Brassicáceas o Crucíferas. Posee un genoma de aproximadamente 130 Mb que fue secuenciado en el año 2000<sup>3</sup>. Se trata del organismo modelo vegetal por excelencia, destacando por su pequeño tamaño, cortos tiempos de generación (obtención rápida de resultados de varias generaciones) y su abundante producción de semillas mediante autopolinización. También destaca por su genoma relativamente sencillo (Figura 1)<sup>4,5</sup>. Además, se transforma fácilmente mediante la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Imagen de *Arabidopsis thaliana*. Modificada a partir de la referencia<sup>31</sup> en la cual se muestra su estructura y se citan algunas de sus características

## 1.2. Regulación de la floración

*Arabidopsis* es el modelo por excelencia para la investigación de numerosos procesos de desarrollo.

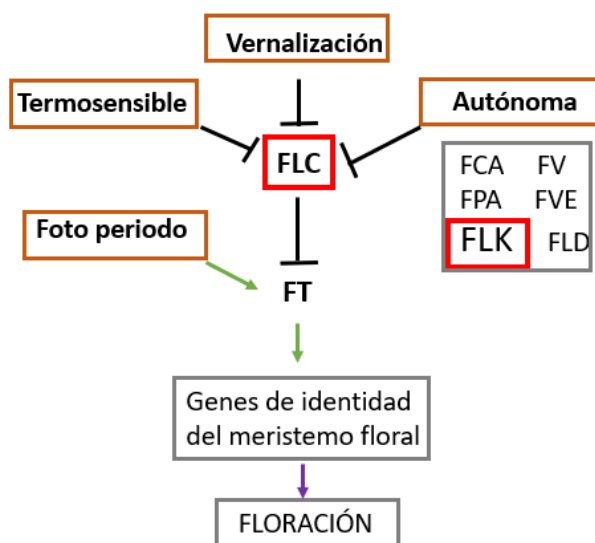
Uno de dichos procesos es la regulación de la floración o transición reproductiva. El proceso de floración es trascendental para una correcta adaptación y éxito reproductivo de las plantas, que además es vital para la conservación de ecosistemas y explotaciones agrícolas. Dados estos motivos, el avance en el conocimiento de los mecanismos de transición floral es de gran relevancia<sup>7</sup>.

El proceso de floración, en el cual la planta abandona la fase vegetativa hacia un estado reproductivo, se conoce como transición floral. En este proceso, intervienen diversas vías interconectadas que canalizan diversos estímulos ambientales y endógenos con la finalidad de que la transición reproductiva se realice bajo las condiciones más adecuadas posibles<sup>8</sup>.

Cabe destacar la función del meristema apical del tallo. Se trata de una estructura que presenta células madres pluripotentes capaces de generar todos los órganos vegetativos y reproductivos, configurando su morfología y la del individuo<sup>9,10</sup>. Durante la fase vegetativa, el meristema solo produce hojas en una roseta de hojas basal, pero una vez se alcanza la etapa reproductiva el meristema varía su estructura, dando lugar a un meristema de inflorescencias,

a partir del cual se desarrollaran los meristemos florales<sup>9,10</sup>.

La floración en las plantas, está controlado por un complejo sistema de rutas promotoras<sup>11,12</sup>. Entre ellas, la ruta de vernalización permite a las plantas adaptar sus ciclos de reproducción dependiendo de las conciones estacionales (mayor exposición al frío)<sup>13</sup>. La ruta termosensible permite a la planta adaptar su momento de floración a la temperatura ambiente, acelerando el momento de la floración en ambientes más cálidos y retrasándolo en ambientes más fríos<sup>14</sup> (Figura 2). Además, la ruta autónoma integra diversas claves endógenas como la edad de la planta<sup>9</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Representación simplificada del control de la floración en Arabidopsis. Las vías promotoras de la floración (recuadro marrones) activan a genes integradores como *FT* o reprimen a los inhibidores de la floración como es el caso de *FLC*. La represión de *FLC* elimina la represión sobre el gen *FT*, lo que genera la inducción de la transición floral. Destacamos los genes de la ruta autónoma, especialmente *FLK*, como también *FLC* de particular importancia en este estudio. Las flechas verdes indican efectos positivos y las negras efectos negativos.

### 1.3. Vía autónoma de la floración.

La vía autónoma integra distintas señales endógenas determinadas por el grado de desarrollo de la planta, por lo que esta vía es relativamente independiente de los factores ambientales. Los componentes de esta ruta son genes de naturaleza diversa que promueven la transición floral mediante la regulación negativa del represor *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<sup>13,15</sup>.

La ruta autónoma no actúa de forma lineal, sino que es una conjunción de diversas actividades que actúan de manera aditiva e independiente<sup>16</sup>. Una de ellas está codificada por el gen *FLOWERING LOCUS K (FLK)*, el cuál produce una proteína con 3 dominios de unión a RNA de tipo KH (*K-homology*) y con localización nuclear. Sus mutaciones de pérdida de función (*flk*) generan un fenotipo de floración tardía debido a elevados niveles de *FLC*<sup>17,18</sup>. No obstante, se desconoce el mecanismo de acción molecular de *FLK* sobre *FLC*.

#### 1.4. Integración de las señales inductoras de la floración

Todas las vías que promueven la floración confluyen en los genes de integración floral, entre los que destaca *FT*. Éstos activan a los genes de identidad del meristemo floral induciendo la floración<sup>9,19</sup>. Los integradores florales pueden ser reprimidos si las condiciones para la floración no son óptimas. En dichas circunstancias *FLC* desempeña un papel destacado<sup>9,18</sup>.

#### 1.5. El promotor 35S

Un promotor es una secuencia de DNA necesaria para activar un gen. Los promotores presentan una zona de unión para la enzima RNA polimerasa encargada de la síntesis del mRNA.

El promotor 35S, derivado del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower Mosaic Virus*, CaMV), induce altos niveles de expresión del gen cuya transcripción gobierna. Es un componente muy habitual en construcciones transgénicas<sup>20</sup>.



## 2. ANTECEDENTES

El gen *FLK*, como queda dicho, codifica una proteína con tres motivos de unión a RNA del tipo KH de unión a RNA que reprime a *FLC*<sup>17,18</sup>. En el laboratorio receptor se caracterizó el gen *PEPPER* (*PEP*), un parálogo cercano en *Arabidopsis* que, sin embargo, actúa de forma antagónica activando a *FLC*<sup>21,22</sup>. Resulta interesante que *FLK* y *PEP*, junto con otros genes KH y otros de diversa naturaleza, interaccionen genéticamente regulando el tiempo de floración, así como la morfogénesis floral y la producción de óvulos y polen<sup>23,24</sup>. Además, sus productos proteicos interaccionan físicamente regulando la maduración cotranscripcional de sus genes diana, lo que llevó a proponer la existencia de una actividad génica conjunta, la función *HUA-PEP*, descripción derivada del nombre de algunos de sus integrantes<sup>23</sup>.

La función *HUA-PEP* parece trascender a su papel durante el desarrollo normal de la planta y las investigaciones en curso apuntan a un papel en situaciones de estrés. En este sentido, las evidencias recientes sugieren que *FLK*, entre otros elementos *HUA-PEP*, podría afectar a las respuestas de la planta a condiciones tales como salinidad excesiva o respuestas frente a hongos patógenos, probablemente a través de su impacto en la homeostasis de determinadas hormonas vegetales como el ácido abscísico y el ácido jasmónico (resultados no publicados). Por consiguiente, resulta de especial interés obtener mutantes de ganancia de función para realizar un análisis genético-funcional de las actividades génicas implicadas.

En colaboración con el laboratorio del Dr. Héctor Candela (Área de Genética, UMH, Campus de Elche) se generaron con anterioridad construcciones de sobreexpresión de diversos genes *HUA-PEP* con las que se transformaron cultivos de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, con la finalidad de transformar *Arabidopsis*. Con este trabajo se inicia el análisis de líneas transformantes portadoras de construcciones *35S::FLK*.

### 3. OBJETIVOS

1. Obtener una población de semillas transformantes con una construcción *35S::FLK*.
2. Seleccionar plantas resistentes (plantas $T_1$ ) al antibiótico selector.
3. Iniciar el análisis de la heredabilidad de la resistencia en su progenie (plantas  $T_2$ ).
4. Análisis del número de inserciones de las líneas seleccionadas.
5. Comprobación de la presencia de la construcción *35S::FLK* en las líneas seleccionadas.
6. Análisis funcional de las mismas.

## 4.MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Abreviaturas

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

**Tabla 1.** En esta tabla se muestran las abreviaturas empleadas, estas corresponden con las abreviaturas del sistema internacional.

### 4.2. Organismos utilizados

#### 4.2.1. *Arabidopsis thaliana*

Como organismo de referencia empleado en este trabajo, se utilizó el ecotipo Columbia-0 (Col-0)<sup>5</sup>. Todas las líneas mutantes que se han empleado han derivado de la transformación de plantas de este ecotipo, las cuales se obtuvieron del distribuidor de semillas europeo NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*, Norwich, Reino Unido), o bien fueron generadas durante este trabajo.

Línea	Fondo genético	Código NASC	Mutágeno	Referencia
<i>flk-2</i>	Col-O	N501523	T-DNA	<sup>17</sup>
<b>35S::<i>FLK</i></b>	Col-O		T-DNA	Este estudio

**Tabla 2.** Líneas mutantes empleadas.

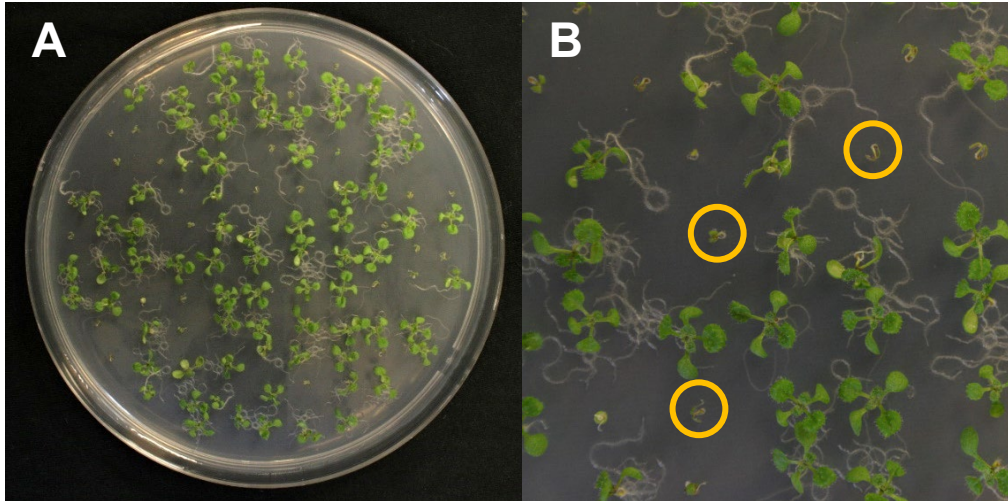
#### 4.2.1.I. Proceso de esterilización de semillas

Se esterilizaron alícuotas de semillas en tubos *Eppendorf*, en una cabina de flujo laminar y junto a un mechero Busen para evitar la contaminación.

La esterilización se realizó con una solución de lejía convencional al 40% y Tritón-X100 al 0,1%. El proceso consistió en añadir 1 ml de solución a las semillas y dejar que actuase durante 8 minutos durante los cuales se agitó de forma constante el tubo *Eppendorf*. Una vez se finalizó el proceso de esterilización, se realizaron 3 lavados sucesivos con agua destilada durante 5 minutos cada uno.

#### 4.2.1.II. Cultivos en placas de Petri

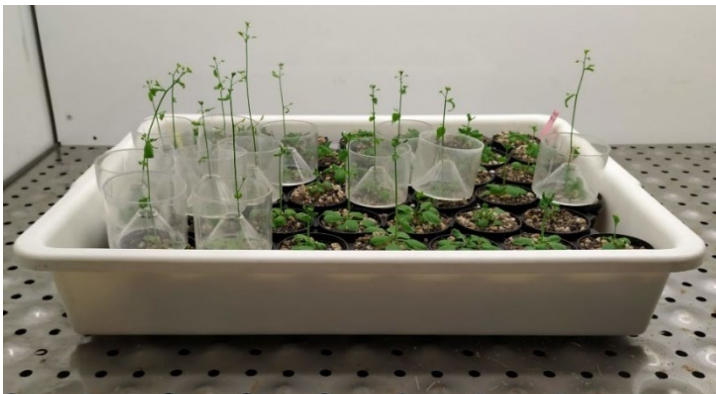
Tras la esterilización de las semillas, estas se depositaron, empleando una pipeta Pasteur, en placas Petri con medio GM (apartado 4.3.1.I). Cuando fue necesario se añadió 20 µg/ml del antibiótico higromicina para seleccionar plantas transgénicas resistentes. Las placas se almacenaron 2 días a 4°C para la estratificación de las semillas. Después se trasladaron a las cámaras de cultivo (incubadores Sanyo MLR-351) con unas condiciones de cultivo del 60-70% de humedad y 21°C de temperatura. La iluminación fue proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca con intensidad 130 µmol/m<sup>2</sup>sec. Transcurridos unos 14 días se trasplantaron a macetas.



**Figura 3.** Selección de plantas resistentes a higromicina. **A)** Placa de higromicina donde se aprecian organismos sensibles y resistentes. **B)** Detalle del panel (A). Los círculos naranjas muestran algunas de las plantas sensibles al antibiótico.

#### 4.2.1.III. Cultivos en maceta

Tras crecer en placa de Petri, las plantas (rosetas) de dos semanas se trasladaron a macetas con un sustrato inerte y esterilizado (apartado 4.3.1.III) contenido en alveolos de plástico (Pöppelmann) y dentro de una bandeja con medio nutritivo ATM (apartado 4.3.1.II). Se cubrieron con film transparente agujereado, para evitar el exceso de humedad. A continuación, se situaron dichas bandejas en los incubadores, con las mismas condiciones de cultivo que las mencionadas en el apartado 4.2.1.V. Pasados unos días, se procedió a retirar el film transparente y a efectuar riegos con agua una o dos veces por semana. Para mantener las plantas separadas entre sí durante su crecimiento, se utilizaron soportes y cilindros de plástico (Arasystem, Betatech).



**Figura 4.** Cultivo en bandeja con macetas individuales de Arabidopsis.

#### 4.2.1. IV. Realización de cruzamientos genéticos.

Para cruzar plantas de diferente genotipo, primero se retiraron todas las estructuras florales, a excepción del pistilo, de una flor de la planta receptora de polen (parental femenino). Para ello nos ayudamos de una lupa binocular (Leica Zoom 2000) y unas pinzas de disección. Posteriormente, las anteras de la planta donante de polen (parental masculino) se pusieron en contacto con el pistilo de la flor receptora. Tras su maduración y una vez seco, el fruto se recogió en un tubo *Eppendorf* y se conservó a 4°C hasta llegado el uso de las semillas que contenía en su interior.

#### 4.2.1.V. Medida del tiempo de floración

Las plantas sometidas a estos ensayos fueron cultivadas en las mismas condiciones de cultivo que se indican en el apartado 4.2.1.III, con la excepción del régimen lumínico. Se realizaron experimentos con régimen de luz continua (24 horas de luz) y experimentos con régimen de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). La respuesta de las plantas al cultivo en luz continua no difiere esencialmente del comportamiento con fotoperiodo de día largo <sup>25</sup>.

Para medir el tiempo de floración se emplean dos parámetros: el número de días desde el inicio de la incubación de las semillas a 21°C hasta la observación del alzado del tallo, y el número de hojas de la roseta producidas en el mismo periodo. Para realizar ambas observaciones, se usó una lupa binocular (Leica Zoom 2000).

#### 4.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Se empleó la cepa C58, resistente a kanamicina y rifampicina, para obtener plantas transgénicas con la construcción de sobreexpresión 35S::*FLK* (apartado 4.6 )

#### 4.2.2.I. Condiciones de cultivo.

Para realizar el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* se empleó medio LB (4.3.1.IV) líquido con 0,5% de glucosa, suplementado con kanamicina y rifampicina. Este proceso se realizó en un incubador de agitación orbital, a 250 rpm con una temperatura de 28-30°C durante el tiempo requerido hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm entre 0,8 a 1,2.

### 4.3. Medios de cultivo, disoluciones y tampones

#### 4.3.1. Medios de cultivo

##### 4.3.1.I. Medio GM (medio de germinación de Arabidopsis)

Medio Murashige y Skoog 2,15 g/L; sacarosa 1%; MES (ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 0,5 g/L. Después se ajustó el pH a 5,7 con KOH 5 M, se añadió agar para plantas a una concentración de 0,8% (m/v) y se autoclavó. En el caso de necesitar higromicina, se dejó atemperar en un baño a 50°C previamente para evitar su degradación. Posteriormente, el medio se vertió en placas de Petri de 140 mm de diámetro en la cabina de flujo laminar, permaneciendo en la cabina hasta alcanzar la temperatura ambiente. Tras esto se almacenaron a 4°C en bolsas precintadas.

##### 4.3.1.II. Medio mínimo ATM (Arabidopsis thaliana Medium)

Se utilizó para realizar el primer riego de las plantas tras ser trasplantadas. Composición:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 mM; Fe-Na(EDTA) 51 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5 mM;  $\text{KNO}_3$  5 mM;  $\text{MgSO}_4$  2 mM;  $\text{CoCl}_2$  0,01  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$  0,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  10  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnCl}_2$  14  $\mu\text{M}$ ; NaCl 10  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoO}_4$  0,2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4$  1  $\mu\text{M}$ <sup>26</sup>.

La preparación de las soluciones madres se realizó diluyendo cada componente en agua destilada y conservándose a 4°C.

#### 4.3.1. III. Sustrato para el cultivo de Arabidopsis en maceta.

Empleamos una mezcla compuesta por perlita, vermiculita y turba en proporciones 2:2:1. Esta mezcla se realizó en bolsas de plástico y se esterilizó en autoclave.

#### 4.3.1.IV. Medio LB (Luria-Bertani medium) con glucosa 0,5%

Medio empleado para realizar cultivos líquidos de bacterias, compuesto de NaCl 1% (m/v), extracto de levadura 0,5% (m/v), triptona 1% (m/v) y glucosa 0,5% (m/v) diluidos en agua destilada, con pH de 7,5. Se autoclavó y envasó en botes estériles, pudiendo conservarse a 4°C durante largos periodos.

Los antibióticos necesarios se incorporaron justo antes de su uso para el cultivo de *Agrobacterium*, procedentes de soluciones stock estériles (apartado 4.3.2.I).

#### 4.3.2. Disoluciones y tampones

##### 4.3.2.I. Antibióticos

Las soluciones stock de cada una de los antibióticos se prepararon en una cabina de flujo laminar, usando agua destilada autoclavada como solvente. Estas soluciones fueron esterilizadas antes de preparar las alícuotas, empleando un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm (Millex GP, Millipore).

Agente	Concentración stock (mg/ml)	Concentración final (µg/ml)	Temperatura de almacenamiento (°C)
Higromicina	20	20	4
Kanamicina	20	20	-20
Rifampicina	10	10	-20

**Tabla 3.** Agentes selectores empleados

##### 4.3.2.II. Solución de infiltración

Se resuspendieron los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* en sacarosa 5% (m/v; preparada justo antes de su uso) y se añadió el detergente Silwet L-77 0,035% (v/v, Lehle Seeds).



#### 4.3.2.III. 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 PCR36*).

#### 4.3.2.IV. 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); Na<sub>2</sub>EDTA 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.

### 4.4. Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

#### 4.4.1. Aislamiento de DNA genómico de Arabidopsis

Tras la recolección de las muestras vegetales en tubos *Eppendorf*, éstas se trituraron con varillas de plástico. Después, se añadió tampón de extracción de DNA (4.3.2.III) y se incubó durante 15 minutos a 37°. Posteriormente, se centrifugó a una velocidad de 13000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió parte del sobrenadante a un tubo nuevo y se añadió isopropanol (1:1, v/v). Se incubó durante 15 minutos a -20°C para precipitar el DNA. Finalizado este tiempo, se volvió a realizar una centrifugación idéntica a la anterior. Tras ella se sustituyó el isopropanol por etanol 70% para realizar el lavado del DNA. Tras centrifugar nuevamente, se eliminó el etanol, dejando que el DNA precipitado se secase antes de resuspenderlo en agua destilada estéril.

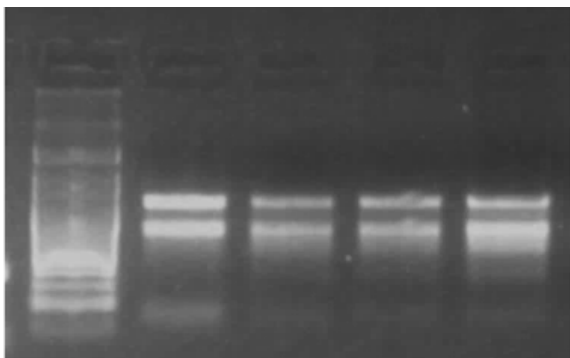
#### 4.4.2. Aislamiento de RNA total de Arabidopsis

Se recolectaron rosetas vegetativas cultivadas durante 12 días en placa y se congelaron con nitrógeno líquido para preservar la integridad del RNA. Después se machacó la muestra con un mortero hasta dejar un polvo fino, congelando en todo momento la muestra y el instrumental con nitrógeno líquido. Se tomó una alícuota de 100 mg de este polvo para la obtención del RNA total con ayuda del kit GeneJET Plant RNA Purification (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo del fabricante.

El RNA obtenido fue incubado con DNAsa I (Thermo Fisher) a 37° durante una 1 hora, para eliminar el DNA genómico. Para concentrar el RNA se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de volumen de LiCl 4M, y se incubó a -80° hasta el día siguiente. Tras esto, se centrifugó a 4° y 14000 rpm durante 10 minutos. Al finalizar se realizó un lavado con etanol al 70% y se secaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos, para eliminar las posibles trazas de etanol. Por último, se procedió a resuspender el RNA en 25µL de agua libre de RNAsas, almacenándolo a -80°C hasta su uso.

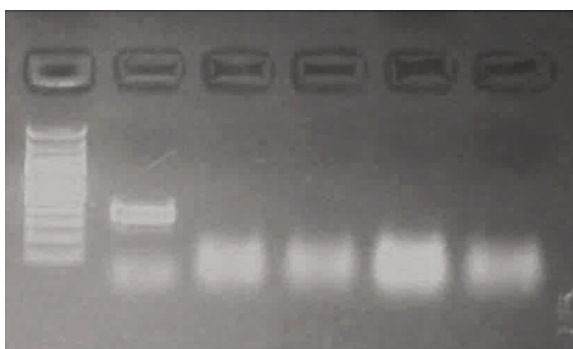
#### 4.4.3. Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado

La determinación del RNA obtenido se realizó con el fotómetro Eppendorf BioPhotometer, el cual mide la concentración del RNA determinando la absorbancia a 260 nm usando una dilución de 1/50 de la muestra. Tras cuantificar las muestras de RNA, se realizó una electroforesis de 0,5 µg de cada una en un gel de agarosa 1,5% y teñido con bromuro de etidio para comprobar su integridad física (figura 5). Previamente, y para asegurar la ausencia restos de RNAsas, el material empleado (cubetas de electroforesis, etc.) se trató con NaOH 0,4M.



**Figura 5.** Análisis cualitativo del RNA en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En la calle de la izquierda se ha cargado el marcador de peso molecular, y en el resto de calles se han cargado 500 ng de diferentes muestras de RNA total.

Para verificar que efectivamente no hay contaminación de DNA genómico, se realizó una PCR con cebadores que solo amplifican DNA genómico para comprobar su ausencia (Figura 6).



**Figura 6.** Visualización en un gel de agarosa de una PCR de DNA genómico. En él se aprecia la ausencia de DNA genómico excepto en la muestra control (calle 2). Calle inicial: marcador de peso molecular.

#### 4.4.4. Electroforesis en gel de agarosa

La preparación del gel de agarosa se llevó acabo añadiendo agarosa (entre 1,5 y 2% de concentración) y bromuro de etidio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (apartado 4.3.2. IV) a una disolución TAE 1X (apartado 4.3.2. IV). Se añadió a las muestras 1,5  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 6X previo a su carga en el gel. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 voltios. Para visualizar los resultados, se empleó un transiluminador (GeneDoc) acoplado a una cámara Canon 1000D, la cual permitió la captura de imágenes de los geles con el programa Eos Utility.

#### 4.5. Síntesis de ácidos nucleicos

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

Se realizaron reacciones de amplificación de secuencias específicas por PCR con las siguientes condiciones: 0,2 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; 0,2  $\mu\text{M}$  de cada uno de los cebadores (Tabla 5);  $\text{MgCl}_2$

1,5 mM; 1 U de Taq DNA polimerasa NZYTaq II (NZYTech); tampón de PCR 10X (NZYTech) y DNA con concentración variable. La reacción se realizó en un termociclador Bio-Rad T100 Thermal Cycler. La reacción se inició con 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para la desnaturalización del DNA, un paso de 30 segundos a 50-60°C (para la hibridación de los cebadores), y 25-30 segundos a 72°C (elongación). Por último, se realizó una elongación adicional de 7 minutos a 72°C.

#### 4.5.2. Retrotranscripción

Mediante esta reacción se obtuvo cDNA a partir de mRNA. La enzima utilizada fue RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Thermo Fisher), según las indicaciones del fabricante. Se partió de 5 µg de RNA total, y como cebador se usó oligo (dT)<sub>18</sub> (Thermo Fisher). El primer paso fue una incubación a 65°C durante 5 minutos para evitar la presencia de estructuras secundarias. Tras esto, se añadieron el resto de componentes y se realizó una incubación a 42°C durante 1 hora con la enzima Revert Aid Transcriptase (200 U, Thermo Fisher) junto a su tampón 5X, dNTP (25 mM) y Ribolock (20 U, Thermo Fisher). Una vez finalizada la reacción se conservó a -80°C hasta su uso.

#### 4.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para este proceso se utilizó RNA extraído de rosetas de 12 días, como se indica en el apartado (apartado 4.4.2.). Tras la retrotranscripción (apartado 4.5.3.), se midió la expresión de ciertos genes a través del sistema LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) utilizando el kit de amplificación Maxima SYBER Green qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para normalizar los niveles de expresión se utilizó el gen de referencia *OTC* (*ORNITINE TRANSCARBAMILASE*)<sup>27</sup>, así como con los niveles silvestres correspondientes. Los resultados de expresión se corrigieron con una curva de calibrado de los cebadores (también llamada curva de eficiencia)<sup>25</sup>. Los valores se expresaron en promedios ± desviación estándar (DE).

#### 4.6. Generación de plantas con la construcción 35S::FLK

Inicialmente se amplificó la región codificante de *FLK* mediante una PCR usando cDNA de plantas silvestres (Col-0) como molde, y cebadores que introducen los sitios *att* en los extremos de la secuencia de interés, necesarios para utilizar la tecnología Gateway de clonación. Después se generó el vector de entrada con el plásmido pGEM-Teasy 221, para transferir el fragmento con *FLK* al vector de destino pMCD32, el cual presenta el promotor de sobreexpresión 35S. Esta construcción fue posteriormente introducida en la estirpe C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, y se seleccionaron los clones positivos gracias a que el plásmido les aporta resistencia a kanamicina y rifampicina. Todos estos procedimientos se realizaron en el laboratorio del Dr. Héctor Candela (Área de Genética, UMH, Campus de Elche).

Una vez obtenidas las células transformantes, fueron utilizadas para inocular 10 ml de LB líquido con glucosa 0,5% suplementado con kanamicina y rifampicina (apartado 4.3.2.I), y se dejó crecer a 28°C en agitación. Este cultivo se empleó para inocular 500 ml del medio anterior, y se incubó a 28°C con agitación hasta lograr una  $A_{600}$  de entre 0,8 y 1,2. En este momento centrifugamos y el precipitado presente se resuspendió en la solución de infiltración (apartado 4.3.2.II). Esta solución se colocó en cubetas de 15 x20x5 cm (largo x ancho x alto), sumergiendo la inflorescencia (a las que previamente se les eliminaron las flores postantesis o autopolinizadas y los frutos) durante unos segundos.

Las plantas infiltradas fueron trasladadas a cámaras de cultivo hasta finalizar su ciclo, y poder recolectar las semillas. Para identificar individuos transformantes ( $T_1$ ), se sembraron semillas de forma masiva (unas 1000-1500 semillas por placa) en placas de Petri con medio de cultivo GM (apartado 4.3.1.I ) con higromicina, para seleccionar aquellos individuos que presentaran resistencia al antibiótico.

## 4.7. Genotipado

### 4.7.1. Genotipado Molecular

En esta tabla se detallan los genotipados moleculares realizados para identificar la presencia de las inserciones de T-DNA empleadas en este trabajo.

Alelo	Cebadores	Tamaño del producto de PCR en pb
<i>flk-2</i>	KH3-2; KH3-7; LBb1	340/450 (silvestre/mutante)
<b>35S::<i>FLK</i></b>	KH3-3; KH3-4	594/307 (DNA genómico/cDNA)

**Tabla 4.** Genotipados moleculares de las mutaciones por inserción de T-DNA.

Las secuencias de los cebadores están indicadas en la Tabla 5.

### 4.7.2 Otros métodos de genotipado

Las plantas que han incorporado la construcción de sobreexpresión *35S::FLK* pueden seleccionarse en medios de cultivo con higromicina, ya que dicha construcción les confiere resistencia a este antibiótico.

## 4.8. Análisis estadístico

### 4.8.1 Prueba $\chi^2$

Para contrastar la hipótesis inicial con los datos fenotípicos observados, se calculó el valor de  $\chi^2$ . Este valor ha de ser menor a  $\chi^2_{1;0,05} = 3,84$  (valor existente con 1 grado de libertad  $p = 0,054$ ) para no rechazar la hipótesis.

### 4.8.2. Análisis de la varianza (ANOVA)

Los datos obtenidos de los experimentos de floración fueron analizados con el programa R commander versión 2.3-0 para realizar un análisis de varianza mediante el test de ANOVA.

#### 4.8.3. Análisis estadístico de los experimentos de qPCR

Se realizaron para comprobar si los niveles de mRNA de los diversos genes medidos en organismos de las líneas de *FLK* presentan diferencias significativas respecto a los niveles silvestres. Para ello se empleó la función Prueba t Student del programa Excel como análisis preliminar, y se obtiene un valor de probabilidad *P* que deber ser menor que el valor límite consenso ( $P=0,05$ ) para asumir que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas.

#### 4.9. Oligonucleótidos empleados

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron sintetizados por Thermo Fisher y Sigma Aldrich, en una escala 25 nmol.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Objetivo	Referencia
<b>ACT2-f</b>	CTCTTAACCGTAAAGCTAACAG	Detección DNA genómico	28
<b>ACT2-r</b>	AGTGAGAATCTTCATGAGTGAG	Detección DNA genómico	28
<b>FLC E2-R</b>	CATGCTGTTTCCCATATCGATCAAG	qPCR <i>FLC</i>	22
<b>FLC RT-F</b>	TTCTCCAAACGTCGCAACGGTCTC	qPCR <i>FLC</i>	22
<b>FT 1F</b>	AGAGAGGTGACTAATGGCTTGG	qPCR <i>FT</i>	22
<b>FT 1R</b>	CAGTGGGACTTGGATTTTCGTA	qPCR <i>FT</i>	22
<b>KH3-2</b>	TGGTTCAAGAGTCGGATCTG	<i>flk-2</i>	22
<b>KH3-3</b>	AGCCCGAATCATCTCTACCAC	35S:: <i>FLK</i> ; qPCR <i>FLK</i>	22
<b>KH3-4</b>	TCCAAGGCTCTATGAACACTTG	35S:: <i>FLK</i> ; qPCR <i>FLK</i>	22
<b>KH3-7</b>	GCGCGTTATATTTCTTTCTAACACATGC	<i>flk-2</i>	22
<b>LBb1</b>	AACCAGCGTGGACCGCTTGCTG	<i>flk-2</i>	SALK
<b>OTC F</b>	TGAAGGGACAAAGGTTGTGTATGTT	qPCR <i>OTC</i>	29
<b>OTC R</b>	CGCAGACAAAGTGGAAATGGA	qPCR <i>OTC</i>	29

**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados. Se indica la finalidad de su uso.

## 5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Obtención de líneas homocigóticas para la inserción 35S::FLK

Se cultivaron múltiples plantas silvestres del ecotipo Col-0. Cuando se encontraban en un estado de desarrollo adecuado para su transformación se realizaron los procesos detallados en el apartado 4.6, utilizando las células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el plásmido pMDC32 que contenía la construcción para la sobreexpresión de *FLK*. Tras completar su ciclo, se recolectaron las semillas de dichas plantas (semillas T<sub>1</sub>). Cabe destacar que cada una de estas plantas T<sub>1</sub> resultantes contienen *a priori* una única inserción que se introduce al azar en cualquier punto del genoma de *Arabidopsis*. Por tanto, cada planta T<sub>1</sub> representa una línea de inserción diferente a las demás, y dicha inserción se encontraría teóricamente en hemicingosis (presente en uno sólo de los cromosomas que forman el par de homólogos donde se produjo dicha inserción).

Posteriormente, se realizó una siembra masiva (apartado 4.6) en placas con higromicina. Partimos inicialmente de 34 plantas T<sub>1</sub> resistentes al antibiótico. Tras su cultivo en tierra, se dejaron secar y se recolectaron las semillas de cada planta de manera individual, numerándolas del 1 al 34 (semillas T<sub>2</sub>). De estas 34 líneas, se sembraron en higromicina de la 1 a la 32. Durante el cultivo en placa, se pudo observar que el desarrollo de algunas de estas líneas era anormal, o bien todas morían en presencia del antibiótico. Por otro lado, también había líneas donde se observó que todas las plantas eran resistentes, lo que podría indicar la presencia de más de una inserción. Por estos motivos se abandonó el seguimiento de todas estas líneas (Líneas 4, 5, 7, 9, 17 y 18; Tabla 6).



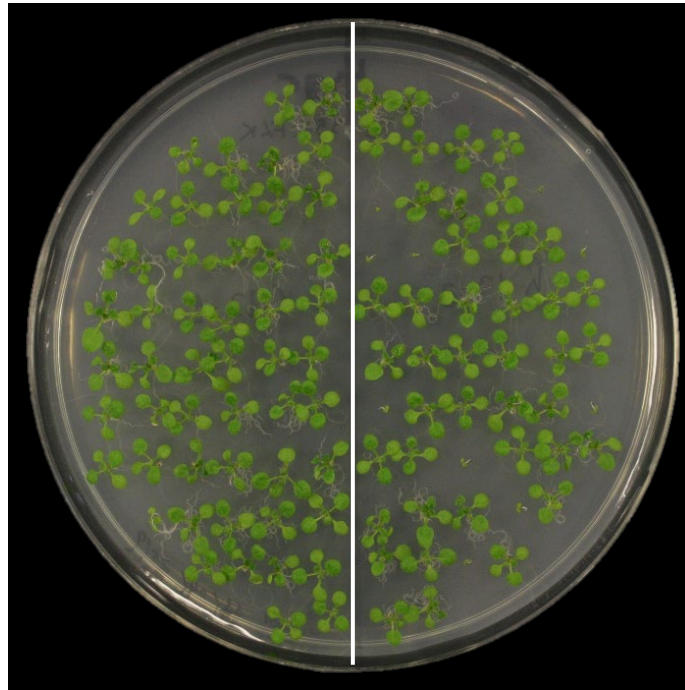
LÍNEA T <sub>2</sub>	OBSERVACIONES	LÍNEA T <sub>2</sub>	OBSERVACIONES
1		17	Todas las plantas eran sensibles
2		18	Todas las plantas eran sensibles
3		19	
4	Todas las plantas eran resistentes	20	
5	Crecimiento anormalmente lento	21	
6		22	
7	Todas las plantas eran resistentes	23	
8		24	
9		25	
10		26	
11		27	
12		28	
13		29	
14		30	
15		31	
16		32	

**Tabla 6.** Desarrollo de las 32 líneas de las líneas T<sub>2</sub> sembradas

Al trasplantar estas plantas T<sub>2</sub> se les asignó un número para indicar su línea de procedencia y el orden dentro de ésta, de tal manera que para la línea 1 teníamos plantas T<sub>2</sub> con los números 1-1, 1-2, 1-3, etc. Las semillas T<sub>3</sub> que se obtuvieron fueron numeradas como las plantas de procedencia.

De las plantas T<sub>2</sub> con las que continuamos, aquellas resistentes a higromicina que se obtuvieron podían ser hemicigóticas para la inserción, o bien homocigóticas. Con el fin de comprobar su genotipo, se realizó la siembra de su descendencia (semillas T<sub>3</sub>), de tal modo que si todas las semillas sembradas de cada planta germinaban y sobrevivían indicaría que la planta madre es homocigótica, mientras que, si algunas morían debido a la presencia del antibiótico, indicaría que la planta de la que provenían era hemicigótica.

Así pues, se sembraron las semillas T<sub>3</sub> de unas 8 plantas por cada línea T<sub>2</sub> obtenida. Tras analizar el comportamiento en higromicina de estas semillas T<sub>3</sub> pudimos establecer que las siguientes plantas T<sub>2</sub> eran homocigóticas (tabla 7).



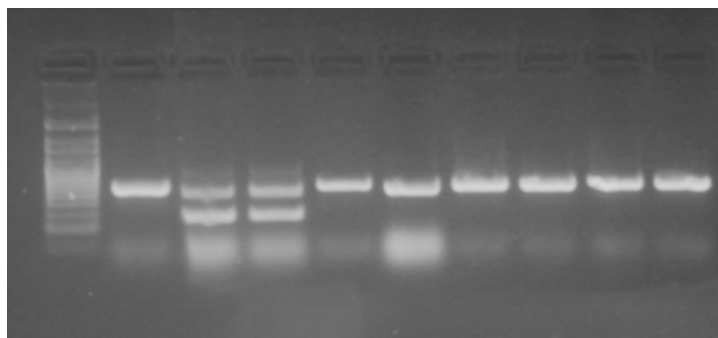
**Figura 7.** Genotipado en placa de higromicina. En la mitad de la izquierda todas las plantas son resistentes, y en la derecha se observan algunas plantas sensibles. Por tanto, provienen de una planta homocigótica (izquierda) y hemicigótica (derecha) para la inserción *35S::FLK*, respectivamente.

LÍNEA DE INSERCIÓN	PLANTAS HOMOCIGÓTICAS	OBSERVACIONES
Línea 2	2-3, 2-5, 2-6, 2-8	
Línea 3	3-6, 3-8	
Línea 6	6-6, 6-9	Crecimiento anómalo
Línea 10	10-4	
Línea 11	11-1, 11-3, 11-4, 11-6	
Línea 12	12-6, 12-9	
Línea 13	13-1, 13-3, 13-4, 13-7, 13-8	
Línea 14	14-9	
Línea 19	19-2, 19-6	
Línea 20	20-3	
Línea 22	22-1, 22-2, 22-3	

**Tabla 7.** En esta tabla se indican de qué líneas T<sub>2</sub> se han obtenido plantas homocigóticas para la inserción, en función de su resistencia a higromicina.

## 5.2. Verificación de la presencia del cDNA de *FLK*

A lo largo de las diferentes siembras y observaciones descritas en el apartado anterior, pudimos advertir cierta variabilidad en el comportamiento de las diferentes líneas. Para verificar la estabilidad de la construcción de T-DNA a través de las sucesivas generaciones, se diseñó un genotipado que permitiera verificar la presencia de la secuencia del cDNA de *FLK*. Los cebadores utilizados hibridan en los exones 2 y 3, respectivamente, del gen *FLK*. Por tanto, la amplificación por PCR dará lugar a una banda de unas 600 pb a partir del DNA genómico en todas las muestras, y otra banda de unas 300 pb a partir del cDNA solo en aquellas muestras que lo contengan.



**Figura 8.** Genotipado del cDNA de *FLK*. La banda de mayor tamaño se corresponde con el DNA genómico, y la de menor tamaño con el cDNA.

Como se observa en la figura 8, muchas de las líneas analizadas solo presentan la banda de DNA genómico, indicando la ausencia del cDNA de *FLK*, aunque muestren resistencia a higromicina. De todas las líneas analizadas, sólo líneas las 6, 11, 13, 14, 29 y 30 retenían el cDNA de *FLK* en la construcción de T-DNA.

Entre ellas se escogió la línea 13 para profundizar en nuestro análisis. Como controles negativos, mantuvimos las líneas 2 y 12. Se escogieron estas tres líneas debido a que se había comprobado que su comportamiento frente a la resistencia a higromicina era robusto y no daba lugar a equívocos por la presencia de falsos positivos o falsos negativos.

### 5.3. Ensayos con las líneas de inserción homocigóticas

#### 5.3.1. Verificación de la presencia de una sola inserción

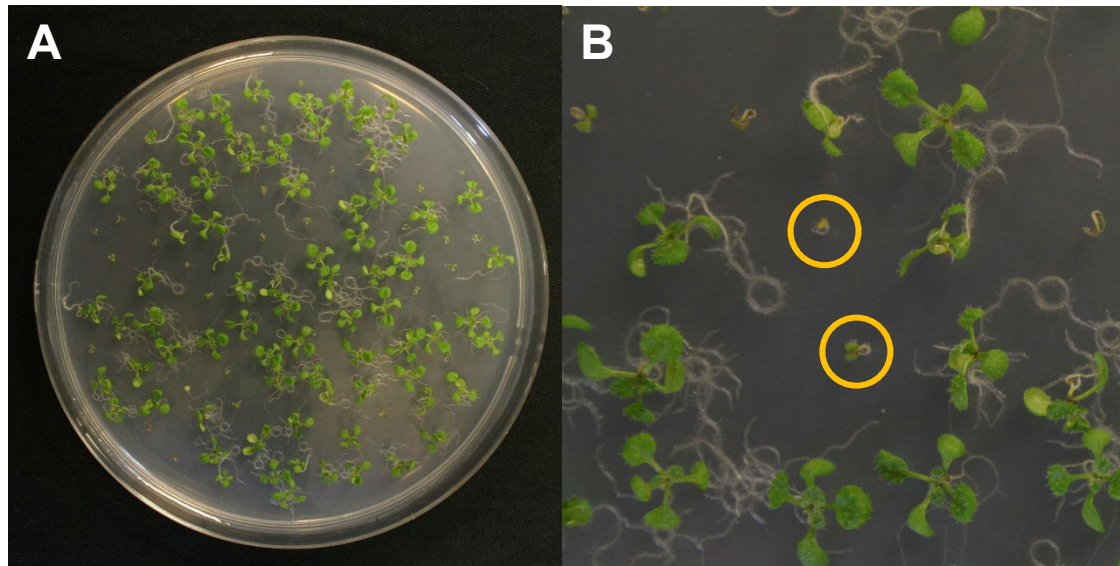
Debido a que ocasionalmente pueden aparecer más de una inserción por planta, es necesario verificar que la presencia de una sola inserción. Para ello se realizaron cruzamientos utilizando polen de cada una de nuestras líneas de inserción, utilizando plantas Col-0 como parentales femeninos. De esta manera, las plantas F<sub>1</sub> resultantes solo mostrarán resistencia a higromicina si han sido fertilizadas con el polen de nuestras líneas de T-DNA sometidas a estudio, lo que nos asegura que el cruzamiento ha sido realizado con éxito.

Tras cultivar las plantas F<sub>1</sub> resultantes, recolectamos de ellas las semillas F<sub>2</sub>. Cabe esperar que el número de plantas sensibles al antibiótico se aproxime a un cuarto del total, indicando la segregación de una inserción única. Si, por el contrario, hubiera dos inserciones independientes, el número de plantas sensibles esperadas sería de un dieciseisavo.

Se realizó un recuento de plantas resistentes y sensibles procedentes de cada familia F<sub>2</sub> generada a partir de los cruzamientos con cada línea (tabla 8). A partir de estos datos, se calculó el valor de  $\chi^2$ , comparando los datos observados con los esperados (1/4 de plantas sensibles).

Familia F <sub>2</sub>	Resistentes	Sensibles	Valor de $\chi^2$
Col-0 x Línea 2	305	106	0,116
Col-0 x Línea 12	304	100	0,013
Col-0 x 35S:: <i>FLK-13</i>	308	99	0,19

**Tabla 8.** Recuento de plantas resistentes y sensibles por cada familia F<sub>2</sub>, y el valor de X<sup>2</sup> obtenido.

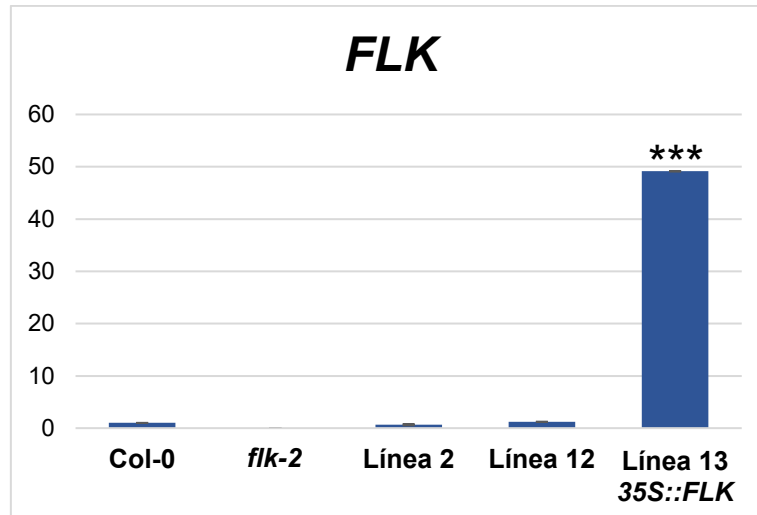


**Figura 9.** A) Placa de higromicina con plantas de la F2 Col-0 x 35S::*FLK*-13. B) Detalle de (A) donde se pueden observar plantas sensibles (algunas están resaltadas con círculos) y resistentes al antibiótico.

Dado que el valor de  $\chi^2$  para todas las líneas es inferior a 3,84 (apartado 4.8.1) se puede concluir que la hipótesis de que nuestras líneas presentan solo una inserción de 35S::*FLK* es aceptada.

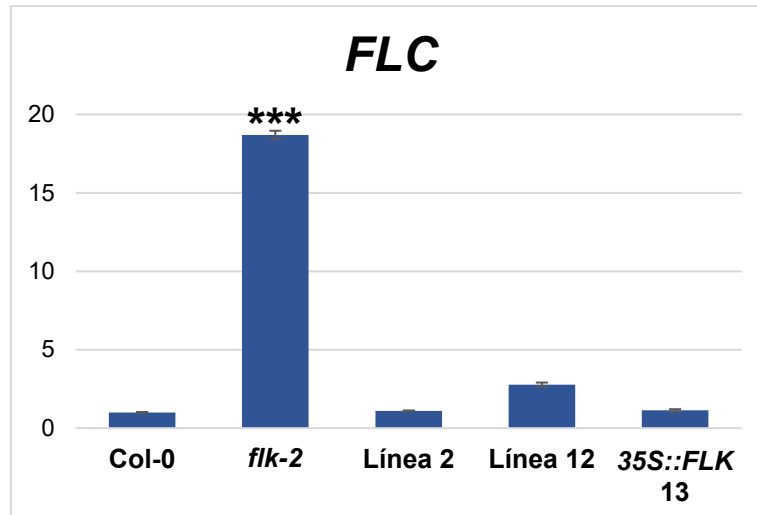
### 5.3.2 Medidas de expresión de los genes *FLK* y *FLC*

El objetivo último de este trabajo es conseguir plantas que sobreexpresen *FLK* para estudiar su comportamiento en solitario o en combinación con otras mutaciones. Por tanto, era necesario verificar si nuestras plantas de la línea 13 (35S::*FLK*) efectivamente presentan un aumento en los niveles de expresión de *FLK*. Para ello se obtuvo cDNA a partir de rosetas de 12 de varias plantas 35S::*FLK*-13, así como de Col-0 y del mutante *flk-2*, como referencias silvestre y de pérdida de función, respectivamente. Mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR) se comprobó que la construcción de sobreexpresión genera 50 veces más cantidad de *FLK* que las plantas silvestres. Por otro lado, los controles negativos (líneas 2 y 12) no muestran ninguna variación significativa respecto al silvestre. Así mismo, el mutante nulo *flk-2* carece de niveles de detectables del mRNA de *FLK* niveles, tal como se esperaba (Figura 10).



**Figura 10.** Expresión relativa de *FLK*. Las barras de error son el promedio de los datos  $\pm$  la Desviación Estándar (DE). Los asteriscos indican diferencias entre 35S::FLK-13 y Col-0. \*\*\*,  $P < 0,001$

*FLK* actúa promoviendo la transición floral mediante la represión del inhibidor central de la floración *FLC*. Así pues, resultaba razonable comprobar si el aumento en los niveles de expresión de *FLK* daba como resultado una reducción en los niveles del mRNA de *FLC*. Como se puede ver en la figura 10, en el mutante nulo *flk-2* se produce un gran aumento de *FLC*, debido a la ausencia de su represor *FLK*. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la línea 13 (35S::FLK) muestra niveles de *FLC* que no difieren significativamente del silvestre ni de las líneas 2 y 12. Por tanto, no hay una mayor represión de *FLC* por parte de *FLK* en nuestros mutantes de sobreexpresión.



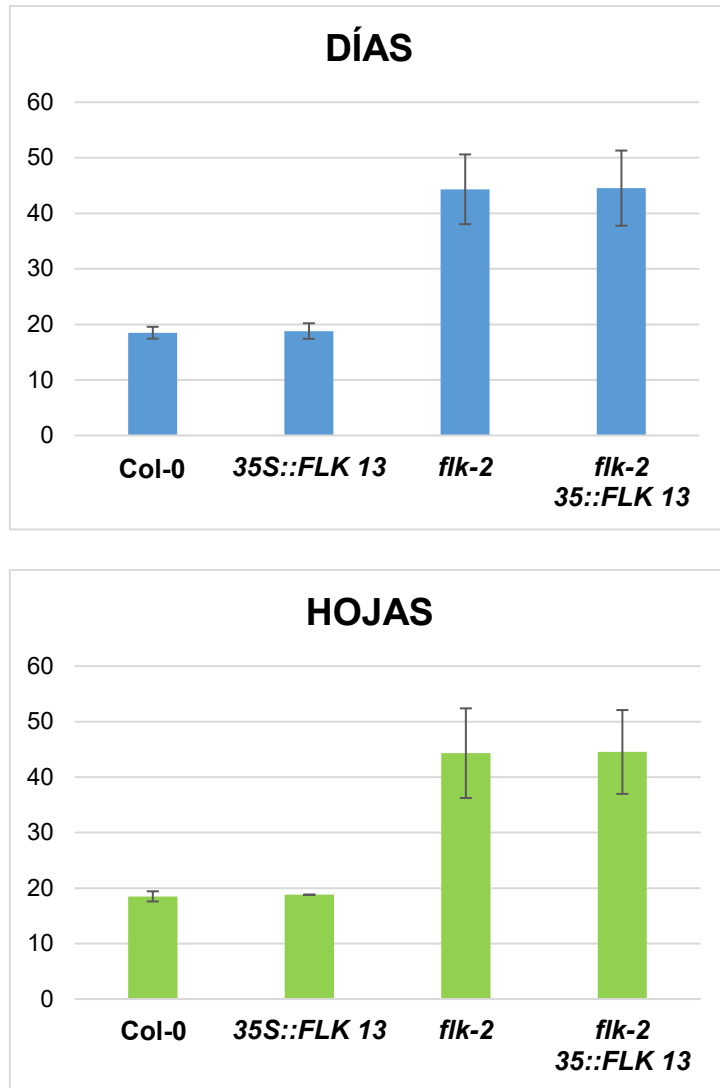
**Figura 11.** Expresión relativa de *FLC*. Las barras de error son el promedio de los datos  $\pm$  la Desviación Estándar (DE). Los asteriscos indican diferencias entre *flk-2* y Col-0. \*\*\*,  $P < 0,001$ .

Estos resultados se han obtenido a partir de una sola réplica biológica, lo que explicaría que se observe un ligero aumento de *FLC* en la línea 12, y que no es significativo biológicamente. Se han de realizar más réplicas de estos experimentos que aporten robustez a los datos.

#### 5.4.3 Obtención de la combinación *flk-2 35S::FLK-13* y estudio del tiempo de floración

Además de haber verificado que hay un aumento de los niveles de expresión de *FLK* en las plantas transformantes que estamos estudiando, es necesario averiguar si dicho aumento sería capaz de rescatar el fenotipo de floración lenta que presentan las plantas con la mutación nula *flk-2*. Tras el cultivo de las semillas resultantes del cruzamiento entre plantas con las dos mutaciones, obtuvimos familias  $F_2$  *flk-2* x *35S::FLK-13*. A partir de las mismas, conseguimos aislar plantas dobles mutantes cuya constitución genética se estableció mediante genotipado molecular (ver Materiales y Métodos).

A continuación se procedió a estudiar su fenotipo en cuanto al tiempo de floración, en comparación con plantas silvestres Col-0, y con cada uno de los mutantes simples *flk-2* y la línea 13 (*35S::FLK*).



**Figura 12.** Tiempo de floración de los genotipos mutantes *35S::FLK-13*, *flk-2* y *flk-2 35S::FLK-13*. Las barras representan el promedio de los datos  $\pm$  Desviación Estándar (DE).

Las gráficas de la figura 12 muestran los datos de floración de cada uno de estos genotipos en número de días (columnas azules) y en número de hojas (columnas verdes) que se observaron cuando las plantas florecieron. Como puede comprobarse, los resultados de este experimento indican que no hay diferencias entre y las plantas silvestres, así como tampoco las hay entre el doble mutante *flk-2 35S::FLK-13* y *flk-2*. Esto demuestra que la incorporación de la sobreexpresión de *FLK* en el mutante nulo *flk-2* no rescata el fenotipo de floración lenta, característico en los mutantes de pérdida de función de la ruta autónoma.



Estos datos son coherentes con la ausencia de efecto sobre la expresión de *FLC* que observamos en las plantas de la línea 13 (*35S::FLK-13*), lo que hubiera provocado una reducción sustancial del tiempo de floración en las plantas *flk-2 35S::FLK-13* respecto al mutante simple *flk-2*.

Además de estos ensayos, también medimos el tiempo de floración de los controles negativos representados por las líneas 2 y 12, y como esperábamos, no mostraron diferencia alguna respecto a las plantas silvestres (datos no mostrados).

Los datos contemplados en este estudio suponen el resultado de un solo experimento de floración en régimen de día largo. Para reforzarlo sería necesario realizar réplicas adicionales, así como medidas en régimen de día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad).

No obstante, resultará más útil en un futuro examinar pormenorizadamente aquellas líneas de inserción positivas para la construcción *35S::FLK* que no fueron objeto del presente estudio, así como buscar nuevas líneas de inserción independientes que contengan dicha construcción. La finalidad fundamental de este trabajo consistía precisamente en la obtención de líneas que, como la aquí analizada (línea 13) retuviera la construcción *35S::FLK* que diera lugar a la sobreexpresión de su mRNA (comprobable mediante qPCR) y que, circunstancialmente, permitiera el rescate fenotípico del mutante *flk-2*, presumiblemente mediante la reducción de los niveles de *FLC*. Éste es un gran indicador tanto funcional (tiempo de floración) como molecular (niveles de *FLC*), el cual nos permitiría analizar con confianza otros efectos de la sobreexpresión del gen *FLK* con respecto a otras respuestas fisiológicas y del desarrollo de la planta. Lamentablemente, no ha sido posible establecerlo con la línea adoptada en este trabajo. Las razones potenciales son diversas y exigen pruebas analíticas que exceden las posibilidades contempladas en un TFG. Entre ellas, posibles errores en la secuencia del cDNA de *FLK*, acaecidos durante el proceso de transformación. Esto podría suponer la presencia de una versión mutante del gen incapaz de recuperar la función en el fondo *flk-2*. Se requeriría secuenciar esta línea para confirmar dicha posibilidad. Otra

posibilidad formal es la necesidad de regiones no codificantes (intrones, etc.) no incluidas en el cDNA, quizá fundamentales para la expresión del gen. Situación que no se ha explorado para *FLK*.

En cualquier caso, la realización del presente trabajo, además de su utilidad formativa por la variedad de técnicas y enfoques empleados, ha servido para alertar sobre los posibles inconvenientes que podemos encontrar en esta colección de mutantes insercionales, o en otras similares para las que el laboratorio se dispone a efectuar su evaluación.

Existen datos del laboratorio (sin publicar) que indican que el gen *FLK*, además de su papel como gen regulador del tiempo de floración, participa en procesos de defensa de la planta frente a situaciones de estrés, tanto biótico (patógenos) como abiótico (salinidad, temperatura, etc.). La transición del desarrollo vegetativo al reproductivo y su relación con los mecanismos de defensa de la planta suponen hoy día un área de investigación muy prolífica<sup>30</sup> donde *FLK* podría desempeñar un importante papel como nódulo de integración entre el tiempo de floración y las señales de estrés.

## 6. Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Antonio Vera y Encarni Rodríguez el brindarme la oportunidad de realizar este trabajo junto a ellos, por todo el apoyo que me han dado desde el principio, por valorar mi labor, por su ayuda y por hacer del laboratorio un segundo hogar para mí.

También me gustaría agradecer Antonio Martínez, como profesor de la asignatura de genética e ingeniería genética por hacer crecer en mí el interés en esta rama de estudio.

Gracias a Lola por su ayuda facilitándome el trabajo.

Gracias al Dr. Héctor Candela y a Eva Rodríguez por la realización de las construcciones genéticas, sin las que no podría haber realizado este trabajo.

Me gustaría agradecer a mis compañeros de la universidad por que habéis sido un constante apoyo, porque, aunque algunos no han terminado aun o han abandonado la carrera sin vosotros todo habría sido mucho más duro y aburrido.

Muchas gracias a mi familia por apoyarme en todo momento y hacer un esfuerzo enorme para que pudiese conseguir mis metas y objetivos y por creer en mí.

Por último muchas gracias Lucia, por se la persona que mas me ha ayudado en mis momentos bajos, por hacer que siempre me quiera superar y en general por hacer que siempre saque mi mejor versión en todos los ámbitos.

## 7. Bibliográfia

1. Anderson K v., Ingham PW. The transformation of the model organism: A decade of developmental genetics. *Nature Genetics*. 2003;33(3S):285–93.
2. Koornneef M, Meinke D. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant Journal*. 2010;61(6):909–21.
3. Kaul S, Koo HL, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon LJ, et al. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*. 2000;408(6814):796–815.
4. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis. Vol. 282, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 1998.
5. Rédei GP. Supervital Mutants of Arabidopsis. *Genetics* [Internet]. 1962;47(4):443–60.
6. Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. The transfer of DNA from agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant journal : for cell and molecular biology*. 2000;23(1):11–28.
7. Blümel M, Dally N, Jung C. Flowering time regulation in crops-what did we learn from Arabidopsis? Vol. 32, *Current Opinion in Biotechnology*. 2015. p. 121–9.
8. Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. Vol. 68, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. p. 2013–37.
9. Zhang J, Campbell RE, Ting AY, Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. Vol. 3, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002. p. 906–18.
10. Carles CC, Fletcher JC. Shoot apical meristem maintenance: The art of a dynamic balance. Vol. 8, *Trends in Plant Science*. 2003;8:394–401.
11. Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. Vol. 68, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. p. 2013–37.

12. Fornara F, de Montaigu A, Coupland G. SnapShot: Control of flowering in arabidopsis. *Cell*. 2010;141.
13. Bouché F, Woods DP, Amasino RM. Winter memory throughout the plant kingdom: Different paths to flowering. *Plant Physiology*. 2017;173(1):27–35.
14. Capovilla G, Schmid M, Posé D. Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(1):59–69.
15. Michaels SD, Amasino RM. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*. 1999;11(5):949–56.
16. Quesada V, Dean C, Simpson GG. Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. Vol. 49, *International Journal of Developmental Biology*. 2005. p. 773–80.
17. Lim MH, Kim J, Kim YS, Chung KS, Seo YH, 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*. 2004;16(3):731–40.
18. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(34):12759–64.
19. Kinmonth-Schultz HA, Tong X, Lee J, Song YH, Ito S, Kim SH, et al. Cool night-time temperatures induce the expression of CONSTANS and FLOWERING LOCUS T to regulate flowering in Arabidopsis. *New Phytologist*. 2016;211(1):208–24.
20. Hull R, Covey SN, Dale P. Genetically modified plants and the 35S promoter: Assessing the risks and enhancing the debate. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2000;12(1):1–5.
21. Ochando I, Jover-Gil S, Ripoll JJ, Candela H, Vera A, Ponce MR, et al. Mutations in the microRNA complementarity site of the INCURVATA4 gene

perturb meristem function and adaxialize lateral organs in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2006;141(2):607–19.

22. 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. *Developmental Biology*. 2009;333(2):251–62.
23. 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. *PLoS Genetics*. 2015;11(2):1–28.
24. Ortuño-Miquel S, Rodríguez-Cazorla E, Zavala-Gonzalez EA, Martínez-Laborda A, Vera A. Arabidopsis HUA ENHANCER 4 delays flowering by upregulating the MADS-box repressor genes FLC and MAF4. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
25. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):45e–45.
26. KRANZ, R. A. Genetic resources in Arabidopsis. *Arabia Inf Serv*. 1987;24.
27. Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL. The Ultracurvata2 Gene of Arabidopsis Encodes an FK506-Binding Protein Involved in Auxin and Brassinosteroid Signaling. *Plant Physiology*. 2004;134(1):101–17.
28. An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant Journal*. 1996;10(1):107–21.
29. 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. *PLoS Genetics*. 2012;8(11):e1003020.

30. Shu K, Luo X, Meng Y, Yang W. Toward a Molecular Understanding of Abscisic Acid Actions in Floral Transition. Vol. 59, Plant and Cell Physiology. 2018. p. 215–21.
31. Conducta de las plantas en la falta de luz - SeedsCactus.com 2020.