



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

El control del final de la floración: identificación de nuevos reguladores de la parada proliferativa

Memoria presentada por

VERÓNICA SÁNCHEZ GERSCHON

para optar al grado de

DOCTOR

por la Universidad Politécnica de Valencia

Directores:

VICENTE BALANZÀ PÉREZ

CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE

Tutora:

MARIA PILAR LÓPEZ GRESA



Valencia, Junio 2023

“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.”

Marie Curie

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto Nº. RTI2018-099239-B-I00) y la Generalitat Valenciana (proyecto Nº. PROMETEU/2019/004) y por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (beca BES 2016078834).

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned in the lower right quadrant of the page. The word "AGRADECIMIENTOS" is centered over this splash in a white, bold, sans-serif font.

AGRADECIMIENTOS

Me van a perdonar si me pongo un poco ñoña en este espacio, pero son muchos años de esfuerzo y hay mucha gente implicada que lo ha hecho posible, tanto dentro como fuera del ámbito científico.

En primer lugar, debo agradecer a mis codirectores Cristina y Vicente, por darme la oportunidad de realizar el doctorado, haber confiado en mí y haberme cuidado estos años, dándome consejo y guía cuando lo necesitaba y teniendo paciencia con mis crisis cuando algo no cuadraba.

Los siguientes responsables directos de que esto haya sido posible son todos los miembros del laboratorio 1.07-09 (antes 1.02-03): Edu, Francisca, Irene M, Ludo, Marcos, Paco, Patri, M Jesús... Seguro que me dejo gente, espero que me perdonen. Gracias por todo el *feedback* en tantos *progresses*, *journals* y *teams* que hemos vivido, por las comidas y picaetas varias, por crear un ambiente de trabajo ideal.

De forma más directa debo agradecer a Majo por su ayuda y apoyo constante, ser siempre una o varias palabras amables y buscar las mil formas de poder hacer un experimento que de golpe necesitaba con urgencia. A Ana B por ayudarme cuando las cuantitativas se veían complicadas y a Irene G y Paz por dejarme material, enseñarme a podar las muestras y a usar el confocal, además de las mil cuestiones que me resolvieron siempre por a o por b y las cervezas al salir que siempre se agradecen.

En el IBMCP en general no puedo olvidarme tampoco de agradecer a MariSol, Javi Forment y Victoria, a la primera por resolverme las dudas en microscopía cada vez que lo necesité, al segundo por el análisis de los datos crudos del RNAseq y a la tercera por intentar siempre encontrar la solución para que mis plantas sobrevivieran el tiempo necesario para los experimentos.

Finalmente, mencionar a las personas que me ha brindado el IBMCP que más me han acompañado en estos años, estén ahora más cerca o más lejos: M Ángeles, Ana A, Jesús, Flo, Marina, Clara, Roser, Rubén. Son lo mejor que me ha dado esta etapa y son lo que estoy segura me llevaré conmigo para siempre tan contenta como con el título. Mil gracias por cubrirme cuando lo necesitaba en el laboratorio, por resolver mis dudas y por hacerme de psicólogos mil y una veces. Y por supuesto gracias por todas las salidas después del labo, por todas las celebraciones, por las excursiones y viajes, por poner sonrisas y risas siempre en mi cara. Sin ustedes, este periodo habría sido mucho más amargo.

Ahora me toca salir del ambiente "tesis" y agradecer a mi entorno, que no es poco.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi familia, y en particular a mis padres y hermano, por ser siempre mi lugar seguro. Gracias por creer en mí, animarme y tirarme siempre hacia arriba y hacia adelante, abrazarme mientras lloro y obligarme a reír después para compensar. Sin su apoyo esto habría sido imposible, los quiero muchísimo. Gracias también a mis perritas terapéuticas, Bimba y Trufa, que me acompañaron en la escritura y soportaron mis abrazos de desestrés.

En segundo lugar, agradecer a los que me acompañan desde que decidí empezar con la ciencia a los 18 años: Sara, Neus y Carles. A nivel tesis gracias por darme soluciones, por corregirme cosas, por proponerme nuevos recursos, etc. A nivel personal gracias por ser un apoyo fundamental y que me puede entender de formas que otros no, por sufrir mi sufrimiento y celebrar mis alegrías, por mil vivencias juntos y ser unos amigos que valen oro.

En tercer lugar, a mis amigas de “toda la vida”: Cris, Estef, Eva, y Moni. Aquellas que no tienen relación con la ciencia, pero siempre se esforzaron en entender a qué me dedico con sus mases y sus menos y sus “no sé a qué hora puedo llegar porque no sé cuánto me tomará el experimento”. Gracias por escucharme incluso sin comprenderme, y por darme consejo y animarme aún así, todas y cada una de las veces.

Tengo que agradecer también a mi grupo de teatro MusSol y especialmente a Félix, Jordi, Lily, Manu, Mariano y Marina. Por ser mi cable a tierra, mi alegría los fines de semana, por las expediciones Pokémon, por los abrazos, las soluciones de Excel, por haber tenido muchísima paciencia con lo que la tesis conlleva en organización y no haberme dejado nunca llegar hasta el final del “me lo dejo”. Me habría vuelto aún más loca sin ustedes.

Gracias a Ana Cucó también por el diseño de portada y elementos varios de la tesis.

Por último, pero ni remotamente menos importante, gracias a David, mi pareja, compañero, apoyo y salvavidas. Gracias por aparecer en el momento menos indicado y quedarte, por mantenerme a flote y animarme en cada instante, por intentar contagiarme tu optimismo, entusiasmo e ilusión por tantísimas cosas, por facilitarme todo en esta etapa final en cada nivel que te fue posible e intentar comprender siempre mis sentimientos. Sin vos el *sprint* final seguro que habría sido más oscuro, te quiero 3000 y más.

A todos, mencionados y no mencionados, mil gracias por todo.



RESÚMENES

RESUMEN

Las flores se producen por la actividad del meristemo inflorescente tras la transición floral. En plantas con inflorescencias indeterminadas, como *Arabidopsis*, el número final de flores producidas por el meristemo inflorescente va a depender de dos factores principales: la tasa de producción de flores del meristemo y la duración de la fase de actividad del meristemo inflorescente. El final de la floración, entendido como el momento en el que la inflorescencia detiene la producción de nuevas flores, está asociado a la parada de la proliferación del meristemo. En este punto, el meristemo deja de iniciar nuevos primordios florales y las flores sin polinizar ya formadas detienen su desarrollo.

Ya hace tiempo que se conoce que la producción de frutos y semillas induce la parada del meristemo, pero no se conocen tanto los mecanismos que controlan este proceso. Durante los últimos años, la regulación del final de la floración ha empezado a elucidarse en *Arabidopsis*. La parada del meristemo al final de la floración está controlada a nivel genético por la ruta FRUITFULL-APETALA2 (*FUL-AP2*), que modula la capacidad proliferativa del meristemo y el cese de su actividad. También se ha demostrado que la parada proliferativa está controlada a nivel hormonal. Se ha propuesto que las auxinas pueden mediar la señalización entre los frutos y semillas y el meristemo. La regulación y respuesta a citoquininas también se ha propuesto como un factor importante controlando la actividad del meristemo al final de la floración. Finalmente, se ha descrito que los meristemos parados al final de la floración se asemejan a meristemos en dormancia a nivel transcriptómico.

En este trabajo nos propusimos ampliar el conocimiento sobre la ruta *FUL-AP2*, identificando nuevos elementos tanto aguas arriba como aguas abajo. Aguas arriba caracterizamos los genes de la familia *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*, una familia de genes cuyo papel se relaciona con el cambio de fase del meristemo de vegetativo a reproductivo. Nos centramos en parte de aquellos genes *SPL* que no están regulados por el miR156: *SPL1*, *SPL12*, *SPL14*, *SPL16* y su relación con *FUL*. Observamos que se tratan de represores de *FUL* y que puedan estar relacionados con la parada de la floración a través de múltiples vías, incluyendo a *FLOWERING LOCUS T (FT)* y la ruta de respuesta a ácido abscísico (ABA). Aguas abajo, nos centramos en la caracterización funcional de factores de transcripción *HOMEODOMAIN PROTEIN (HB)*, centrándonos en los genes *HB21*, *HB40* y *HB53*, genes relacionados con el establecimiento de la dormancia de los meristemos axilares. En este trabajo observamos que estos genes se acumulan al final

de la floración y actúan de manera redundante en esta parada de la floración, probablemente a través de un incremento de la respuesta a ABA.

Con este trabajo, hemos ampliado el conocimiento sobre la red reguladora de la parada de la floración, caracterizando el papel de elementos adicionales de la misma y aportando evidencias sobre el papel de la señalización por ABA en el control de la parada del meristemo inflorescente.

RESUM

Les flors es produeixen per l'activitat del meristem inflorescent rere la transició floral. En plantes amb inflorescències indeterminades, com *Arabidopsis*, el número final de flors produïdes pel meristem inflorescent dependrà de dos factors principals: la taxa de producció de flors del meristem i la duració de la fase d'activitat del meristem inflorescent. El final de la floració, és a dir, el moment en el que la inflorescència deté la producció de noves flors, està associat a la parada de la proliferació del meristem. En aquest punt, el meristem deixa d'iniciar nous primordis florals i les flors sense pol·linitzar ja formades detenen el seu desenvolupament.

Ja fa temps que se sap que la producció de fruits i llavors indueix la parada del meristem, però no es coneixen tant els mecanismes que controlen aquest procés. Durant els últims anys, la regulació del final de la floració ha començat a elucidar-se en *Arabidopsis*. La parada del meristem al final de la floració està controlada a nivell genètic per la ruta FRUITFULL-APETALA2 (*FUL-AP2*), que modula la capacitat proliferativa del meristem i el cessament de la seua activitat. També s'ha demostrat que la parada proliferativa està controlada a nivell hormonal. S'ha proposat que les auxines poden mediar la senyalització entre els fruits i llavors i el meristem. La regulació i resposta a citoquinines també s'ha proposat com un factor important controlant l'activitat del meristem al final de la floració. Finalment, s'ha descrit que els meristems aturats al final de la floració s'assemblen a meristems en dormància a nivell transcriptòmic.

En aquest treball ens vam proposar ampliar el coneixement sobre la ruta *FUL-AP2*, identificant nous elements tant aigües amunt com aigües avall. Aigües amunt caracteritzem els gens de la família *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*, una família de gens relacionada amb el canvi de fase del meristem de vegetatiu a reproductiu. Ens centrem en part d'aquells gens *SPL* que no estan regulats pel miR156: *SPL1*, *SPL12*, *SPL14*, *SPL16* i la seua relació amb *FUL*. Observem que es tracten de repressors de *FUL* i que poden estar relacionats amb la parada de la floració a través de múltiples vies, incloent a *FLOWERING LOCUS T (FT)* i la ruta de resposta a àcid abscísic (*ABA*). Aigües avall, ens centrem en la caracterització funcional de factors de transcripció *HOMEODOMAIN PROTEIN (HB)*, centrant-nos en els gens *HB21*, *HB40* i *HB53*, gens relacionats amb l'establiment de la dormància dels meristems axil·lars. Observem que aquests gens s'acumulen al final de la floració i actuen de manera redundent en aquesta parada de la floració, probablement a través d'un increment de la resposta a *ABA*.

Amb aquest treball, hem ampliat el coneixement sobre la xarxa reguladora de la parada de la floració, caracteritzant el paper d'elements addicionals de la mateixa i aportant evidències sobre el paper de la senyalització per ABA en el control de la parada del meristem inflorescent.

ABSTRACT

Flowers are produced by the activity of the inflorescence meristem after the floral transition. In plants with indeterminate inflorescences, such as *Arabidopsis*, the final number of flowers produced by the inflorescence meristem depends on two main factors: the rate of flower production by the meristem and the duration of the phase of inflorescence meristem activity. The end of flowering, understood as the moment when the inflorescence stops the production of new flowers, is associated with the meristem proliferative arrest. At this time point, the meristem ceases to initiate new floral primordia and the unpollinated flowers already formed arrest their development.

It is well established that fruit/seed production induces inflorescence meristem arrest, but the mechanisms controlling this process have remained elusive. During the last years, the regulation of the end of flowering has started to be elucidated in *Arabidopsis*. The meristem arrest at the end of flowering is controlled at the genetic level by the *FRUITFULL-APETALA2* (FUL-AP2) pathway, that modulates meristem proliferative capacity and the cessation of its activity. The meristem arrest has been also shown to be controlled at the hormonal level. Auxins have been proposed to mediate the fruit/seed signal to the meristem. Cytokinins regulation and response have been also proposed as important factors controlling the meristem activity at the end of flowering. Finally, it has been also described that arrested meristems at the end of flowering resemble dormant meristems at the transcriptomic level.

In this work we aim to enlarge the existing knowledge about the FUL-AP2 pathway, identifying new elements both upstream and downstream. Upstream, we characterized the *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (SPL) family of transcription factors, a family of genes linked to the phase change of the meristem from vegetative to reproductive. We focus on part of those SPL genes that are not regulated by miR156 (*SPL1*, *SPL12*, *SPL14*, *SPL16*) and their relationship with *FUL*. We observed that they are *FUL* repressors and that they may be related to flowering arrest through multiple pathways, including *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) and the abscisic acid (ABA) response pathway. Downstream, we focus on the *HOMEBOX PROTEIN* (*HB*) family of transcription factors, and more specifically on the *HB21*, *HB40* and *HB53* genes, all of them related to the establishment of dormancy of the axillary meristems. In this work we observed that these genes accumulate at the end of flowering and act redundantly at this flowering arrest, probably through an increase in the response to ABA.

With this work we have expanded the existing knowledge about the proliferative arrest regulatory network, characterizing novel involved elements and providing evidence on the role of ABA signaling in the inflorescent meristem arrest control.



ÍNDICE

Índice de contenidos

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESÚMENES.....	V
RESUMEN	VII
RESUM.....	IX
ABSTRACT	XI
ÍNDICE.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
La parada de la proliferación en plantas monocárpicas.....	3
El final de la floración en Arabidopsis	4
Mantenimiento de la indeterminación del meristemo.	7
La ruta FUL/AP2.....	8
Antes de la ruta FUL/AP2: Los genes <i>SPL</i>	11
Después de la ruta FUL/AP2: dormancia, ácido abscísico y genes <i>HB</i>	16
OBJETIVOS	21
CAPÍTULO 1	25
Los genes <i>SPL-ANQ</i> comparten patrón de expresión con <i>FUL</i>	27
Los genes <i>SPL-ANQ</i> son necesarios para el correcto desarrollo de la planta y el control de la parada proliferativa.....	30
Relación de los genes <i>SPL-ANQ</i> con el gen <i>FUL</i>	38
Los genes <i>SPL-ANQ</i> podrían estar regulando la parada de la proliferación afectando a la señalización por ABA	47
Los mutantes en los genes <i>SPL-ANQ</i> son insensibles al estrés por sacarosa	54
Discusión.....	59
CAPÍTULO 2	67
<i>HB21</i> se acumula en el ápice floral cerca de la parada de la floración	69

<i>HB21</i> es capaz de inducir la parada del meristemo cuando se expresa en el SAM.	71
<i>HB21</i> controla la parada del meristemo de manera redundante con <i>HB40</i> y <i>HB53</i>	74
<i>HB21</i> controla la parada del meristemo controlando la respuesta a ABA	82
Discusión.....	87
DISCUSIÓN GENERAL	91
CONCLUSIONES	97
MATERIAL Y MÉTODOS.....	101
Material biológico y condiciones de cultivo.....	103
Métodos de biología molecular	106
Transformación genética	114
Análisis fenotípico.....	116
Estudios relacionados con ácido abscísico	116
Inducción con Dexametasona.....	117
Estudios de expresión.....	117
Obtención de fotografías.	119
Análisis transcriptómico: RNAseq.....	120
Análisis estadístico.....	121
BIBLIOGRAFÍA	123
ANEXOS.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
Figura I.2. La eliminación de frutos produce una flor indeterminada.....	6
Figura I.3. La mutación del gen <i>FUL</i> no produce flor terminal.....	10
Figura I.4. La inducción de <i>AP2</i> recupera la actividad del meristemo.....	10
Figura I.5. Modelo de la ruta <i>FUL-AP2</i>	11
Figura I.6. Árbol sin enraizar de 120 dominios SBP hecho por maximum-likelihood.....	12
Figura I.7. Los genes <i>SPL</i> de <i>Arabidopsis</i>	14
Figura I.8. Los genes <i>SPL-ANQ</i> se expresan al final de la proliferación y pueden activar el promotor de <i>FUL</i>	15
Figura I.9. Respuesta a la inducción de <i>AP2</i> en el meristemo inflorescente.....	17
Figura I.10. Árbol filogenético de la familia HD-ZIP en <i>Arabidopsis</i>	18
Figura I.11. Expresión de los genes HD-ZIP I en <i>Arabidopsis</i>	19

CAPITULO 1

Figura C1.1. Patrón de expresión de <i>FUL</i> , <i>SPL1</i> y <i>SPL16</i>	28
Figura C1.2. Expresión relativa de <i>YFP</i> en inflorescencia apical en líneas <i>SPL16pro::SPL16-YFP</i> ...30	
Figura C1.3. Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en los genes <i>SPL1-ANQ</i> según la información disponible en el TAIR.....	31
Figura C1.4. Conteo de flores en Col-0 y <i>spl12/14/16</i>	32
Figura C1.5. Fenotipo de las plantas <i>spl-quad</i>	33
Figura C1.6. Conteo de flores en Col-0 y <i>spl-quad</i>	34
Figura C1.7. Comparación de los frutos <i>spl-quad</i> y <i>35S::FUL</i>	35
Figura C1.8. Diagrama del gen <i>OTU1</i> y conteo de flores producidas por sus mutantes.....	36
Figura C1.9. Diagrama de porcentaje de plantas según sus frutos producidos en Col-0, <i>otu1-1</i> y <i>otu1-2</i>	37
Figura C1.10. Patrón de expresión en distintos momentos del desarrollo vegetativo de plantas con el reportero <i>FULpro:GUS</i> en fondo Col-0 y <i>spl-quad</i>	38
Figura C1.11. Análisis por qRT-PCR de los niveles de transcrito de <i>FUL</i> en el meristemo apical del tallo a lo largo del desarrollo de Col-0 y <i>spl-quad</i>	40
Figura C1.12. Diagrama de la localización del CRISPR del gen <i>FUL</i>	40
Figura C1.13. Conteo de hojas de roseta y caulinares producidas y días tras la germinación necesarios en Col-0, <i>spl-quad</i> , <i>ful-2</i> y <i>spl-quad ful-cr</i> hasta el alzado y primera flor en antesis en día largo.....	42
Figura C1.14. Conteo de hojas de roseta y caulinares producidas y días tras la germinación necesarios en Col-0, <i>spl-quad</i> , <i>ful-2</i> y <i>spl-quad ful-cr</i> hasta el alzado y primera flor en antesis en día corto.....	43

Figura C1.15. Fenotipo de las plantas <i>spl-quad ful-cr</i>	45
Figura C1.16. Conteo de flores producidas en Col-0, <i>spl-quad</i> , <i>ful-2</i> y <i>spl-quad ful-cr</i> desde el alzado hasta la parada proliferativa.....	47
Figura C1.17. Categorías GO enriquecidas para los DEGs en meristemos del mutante <i>spl-quad</i> frente al genotipo silvestre a tres semanas del alzado.....	50
Figura C1.18. Categorías GO enriquecidas para los DEGs en meristemos del mutante <i>spl-quad</i> frente al genotipo silvestre que se mantienen a lo largo del desarrollo floral.....	51
Figura C1.19. Comparación de DEGs en <i>spl-quad</i> y AP2ind.....	53
Figura C1.20. Porcentaje de germinación y grado de desarrollo de plantas Col-0, <i>spl-quad</i> , 35S::SPL14 y <i>nced3-2</i> en placas suplementadas con distintas concentraciones de sacarosa.....	57
Figura C1.21. Crecimiento en placas MS con 250mM de sacarosa de plantas Col-0, <i>spl-quad</i> , 35S::SPL14 y <i>nced3-2</i>	58
Figura D1.1. Expresión de los genes <i>SPL</i> en meristemo apical.....	60
Figura D1.2. La represión del gen <i>TCP7</i> produce efectos similares en inflorescencias que el quintuple mutante <i>spl-quad ful-cr</i>	61
Figura D1.3. Modelo de ruta de <i>SPL-ANQ</i> en meristemo apical inflorescente.....	65
Tabla C1.1. Listado de DEGs activados en <i>spl-quad</i> y reprimidos en AP2ind relacionados con estrés.....	54
Tabla C1.2. Log2FC, padj y rpkms de genes de interés relacionados con <i>SPL-ANQ</i>	55

CAPITULO 2

Figura C2.1. La expresión de <i>HB21</i> aumenta cerca del final de la floración.....	70
Figura C2.2. La acumulación de WUS correlaciona negativamente con la activación de <i>HB21</i>	71
Figura C2.3. La inducción de <i>HB21</i> induce la parada de flores y meristemo.....	73
Figura C2.4. La parada del meristemo depende de la intensidad de la inducción de <i>HB21</i>	74
Figura C2.5. Diagrama del gen <i>HB21</i> según la información disponible en TAIR.....	75
Figura C2.6. Conteo de flores producidas en la inflorescencia principal en Col-0, <i>hb21-1</i> y <i>hb21-2</i> una vez producida la parada proliferativa.....	76
Figura C2.7. Número de flores producidas por mutantes simples y combinación de mutantes <i>HB21</i> , <i>HB40</i> y <i>HB53</i> en el tiempo.....	77
Figura C2.8. La expresión relativa de <i>HB21</i> , <i>HB40</i> y <i>HB53</i> aumenta al final de la floración en el ápice de la inflorescencia principal.....	78
Figura C2.9. Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en los genes <i>HB40</i> y <i>HB53</i> según la información disponible en el TAIR.....	79
Figura C2.10. <i>HB21</i> , <i>HB40</i> y <i>HB53</i> actúan redundantemente en la parada de la actividad del meristemo.....	80
Figura C2.11. Fenotipo de las plantas Col-0, <i>hb21-3</i> , <i>hb40</i> , <i>hb53-1</i> , <i>hb21-3/hb53-1</i> y <i>hb21-3/hb40/hb53-1</i>	81

Figura C2.12 Grupo de yemas florales en la inflorescencia principal con parada proliferativa en Col-0, <i>hb21-3</i> , <i>hb53-1</i> , <i>hb40</i> , <i>hb21-3 hb53-1</i> y <i>hb21-3 hb40 hb53-1</i>	82
Figura C2.13. Análisis de enriquecimiento funcional con las categorías GO sobrerrepresentadas correspondientes a proceso biológico.....	84
Figura C2.14. <i>HB21</i> induce la producción de ácido abscísico.....	85
Figura C2.15. El ácido abscísico detiene el desarrollo del ápice inflorescente principal.....	86
Tabla C2.1. Log ₂ FC, padj y tpms de genes de interés relacionados con <i>HB21</i> , <i>HB40</i> y <i>HB53</i>	87

DISCUSIÓN GENERAL

Figura D.1. Modelo de integración de la ruta de <i>SPL-ANQ</i> y <i>HB21</i> , <i>HB40</i> y <i>HB53</i> en el meristemo apical inflorescente.....	95
---	----

MATERIALES y MÉTODOS

Tabla M.1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.....	103
Tabla M.2. Genotipos y líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> utilizadas en este trabajo.....	104
Tabla M.3. Antibióticos y concentraciones utilizadas en medios bacterianos.....	105
Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados a lo largo de la tesis.....	109
Tabla M.5. Vectores utilizados y obtenidos en este trabajo.....	111

ANEXOS

ANEXO I. Secuencia de aminoácidos de las proteínas FUL y FUL-cr.....	137
ANEXO II. Categorías GO de los DEGs activados y reprimidos en <i>spl-quad</i> vs Col-0 3sda.....	138
ANEXO III. Categorías GO de los DEGs en todo el desarrollo de <i>spl-quad</i> vs Col-0.....	144
ANEXO IV. Categorías GO de los DEGs activados y reprimidos en <i>spl-quad</i> 3 sda vs AP2ind.....	145
ANEXO V. Secuencia de aminoácidos de <i>HB21</i> y <i>HB21-3</i>	148
ANEXO VI: Categorías de los DEGs activados y reprimidos al inducir <i>HB21</i>	149
ANEXO VII. Categorías GO de DEGs inducidos en <i>HB21</i> ind y reprimidos en AP2ind.....	156
ANEXO VIII. Abreviaturas.....	158

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned in the lower right quadrant of the page. The word "INTRODUCCIÓN" is centered over this splash in white, uppercase letters.

INTRODUCCIÓN

La parada de la proliferación en plantas monocárpicas

En el reino de las plantas pueden distinguirse dos tipos de estrategias reproductivas. Por una parte, existe la semelparidad, donde se maximiza la progenie en un único ciclo reproductivo tras el cual las plantas inician un proceso de senescencia y mueren, mientras que por otra parte existe la iteroparidad, donde las especies alternan ciclos reproductivos con otros de crecimiento vegetativo (Amasino, 2009, Bleecker et. al., 1997). Las plantas con semelparidad son también conocidas como monocárpicas, mientras que las que poseen iteroparidad se consideran policárpicas (Amasino, 2009).

Todos los tejidos de las plantas se desarrollan a partir de dominios de células madre conocidas como meristemas. Durante el desarrollo embrionario se forman y establecen los dos meristemas principales de la plántula, el meristemo apical de la raíz en posición basal, del que se derivaran todos los tejidos presentes en la raíz, y el meristemo apical del tallo (SAM, del inglés *Shoot Apical Meristem*) en posición apical, del que derivara todos los tejidos de la parte aérea. Tras la germinación, el SAM inicia una etapa de crecimiento vegetativo produciendo en sus flancos hojas. Posteriormente, tras la transición floral, se inicia el desarrollo reproductivo donde el SAM inicia la producción de flores, desarrollándose a partir de él la inflorescencia. Durante esta etapa del desarrollo el SAM recibe el nombre de meristemo inflorescente. La principal diferencia entre plantas monocárpicas y policárpicas es que en plantas monocárpicas como *Arabidopsis*, el SAM, así como todos los meristemas activos en la parte aérea, se convierten en meristemas inflorescentes, mientras que en las plantas policárpicas se mantienen algunos meristemas latentes capaces de reiniciar el crecimiento vegetativo, o pueden revertir los meristemas inflorescentes a meristemas vegetativos tras la floración (Albani et al., 2010; Amasino, 2009).

Estudiar los mecanismos que controlan la duración de los ciclos reproductivos en plantas monocárpicas es de especial interés a nivel agronómico, ya que muchos cultivos presentan este tipo de ciclo de vida, donde el periodo de producción de flores y frutos tiene un impacto importante en la productividad de los mismos (Hensel et al., 1994). *Arabidopsis thaliana* es el sistema modelo más utilizado en Genética Molecular de Plantas, entre otras cosas por su rápido crecimiento, su facilidad de transformación y el gran conocimiento acumulado sobre su biología, lo cual nos aporta herramientas muy útiles y directas para abordar estudios complejos (Bleecker et al., 1997; Hensel et al., 1994; Leonelli, 2007). Al ser *Arabidopsis* una planta monocárpica, tiene un especial interés abordar el estudio del control de la duración del ciclo reproductivo y el final de la floración en esta especie y, de

hecho, en los últimos años se han publicado varios trabajos que aportan información relevante al respecto (Balanzà et al., 2018; González-Suárez et al. 2023; Martínez-Fernández et al., 2020; Merelo et al., 2022; Walker et al., 2023; Ware et al. 2020).

El final de la floración en Arabidopsis

Como se ha comentado anteriormente, tras la germinación *Arabidopsis* inicia una fase de crecimiento vegetativa, donde el meristemo apical del tallo produce hojas siguiendo una filotaxis en espiral y formando una roseta sin elongación de los entrenudos (Albani et al., 2010; Bleecker et al., 1997). El final de la fase vegetativa viene determinado por la transición floral y el inicio de la fase reproductiva. Esta transición está determinada por las condiciones ambientales, por factores endógenos y el genotipo de la planta, y provoca que el SAM adquiera identidad de meristemo inflorescente, que da lugar a flores en lugar de hojas (Bleecker et al., 1997; Albani et al., 2010). Tras la transición floral, el tallo de la inflorescencia principal elonga, lo que morfológicamente se traduce en el alzado de la inflorescencia, y produce una serie de ramas secundarias que también contribuyen al desarrollo reproductivo (coflorescencias) (Bleecker et al., 1997). La transición floral es un proceso crucial que necesita ser regulado finamente, de forma que la floración ocurra en las mejores condiciones para asegurar su éxito reproductivo (Albani et al., 2010). El final de la etapa reproductiva conlleva la parada de la proliferación del meristemo inflorescente y la detención de la producción de nuevas flores. Sin embargo, bajo ciertas condiciones o tratamientos, como por ejemplo la poda de los frutos ya formados, un meristemo parado puede reactivarse produciendo nuevamente flores (**Fig. I.1.F**), por lo que el SAM se puede considerar un meristemo durmiente durante la parada de la proliferación (Hensel et al., 1994).

El fenómeno por el cual la proliferación de todos los meristemas de la planta se detiene tras el cese de la actividad del SAM en la inflorescencia principal de *Arabidopsis* se denominó parada global de la proliferación (GPA, del inglés Global Proliferative Arrest; Hensel et al., 1994). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la parada de todos los meristemas inflorescentes no está tan sincronizada y que no depende de todos los frutos formados, sino de los últimos frutos producidos por cada inflorescencia, pudiéndose descoordinar mediante la poda de frutos cercanos a cada meristemo inflorescente o la adición puntual de hormonas como las auxinas (Ware et al., 2020). Por este motivo hablaremos de parada de la floración o parada proliferativa en lugar de GPA. En esta parada proliferativa, el meristemo de la inflorescencia principal es el primero en parar, seguido de

los meristemos secundarios en los siguientes días de desarrollo, tras lo cual la planta comienza a senescer (Hensel et al., 1994; Ware et al., 2020).

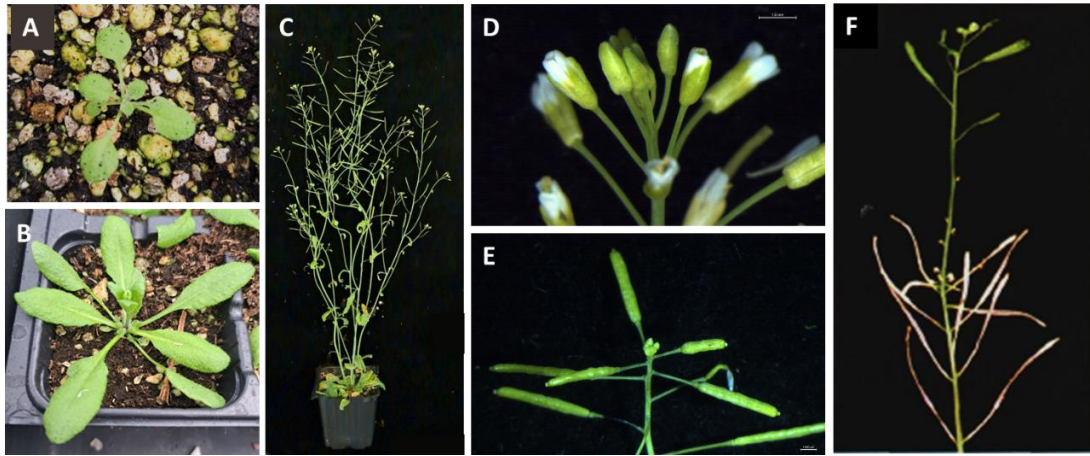


Figura I.1. Desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. (A) Plántula de *Arabidopsis* 14 días tras la germinación. (B) Plántula de *Arabidopsis* tras el alzado. (C) Planta de *Arabidopsis* tres semanas después del alzado. (D) Meristemo inflorescentes activo. (E) Meristemo inflorescente parado. (F) Inflorescencia que ha reactivado su actividad proliferativa tras su parada. (F) Tomada de Bleecker y Patterson, 1997.

La parada de la floración ha sido motivo de estudio desde el siglo pasado no solo en *Arabidopsis* sino también en otras especies monocárpicas como guisante o tomate. Se consideraba que debía haber un sistema de comunicación entre los frutos y el resto de la planta, pues al eliminar los frutos se podía alargar la fase reproductiva y, en consecuencia, retrasar la parada proliferativa y finalmente la senescencia de la planta (Hensel et al., 1994; Leopold et al., 1959; Murneek, 1926). Aún así, la eliminación de los frutos no eliminaba la parada de los meristemos y la senescencia, sino que sólo los retrasaba y ésta finalmente ocurría, convirtiendo el meristemo apical de *Arabidopsis* en una flor terminal (Fig. I.2; Hensel et al., 1994; Lockhart et al., 1961; Noodén et al., 2001). Se propuso entonces que los frutos podrían estar produciendo algún tipo de hormona, bien de las ya conocidas o alguna desconocida, que indujera la parada meristemática. Se la denominó “hormona de la muerte” (Engvild, 1989; Wilson, 1997) y se comprobó que era una señal móvil transmisible por injertos (Biswas et al., 1980; Murneek, 1932, Proebsting et al., 1977). También se propuso que la parada proliferativa podría estar determinada por algún tipo de relación fuente-sumidero (Biswas et al., 1980; Kelly et al., 1988; Sinclair et al., 1975). Finalmente, pero no menos importante, se propuso que debía existir una regulación a nivel genético, que podría estar integrada con las anteriores y/o depender también de señales endógenas diferentes (Balanzà et al., 2018; Hensel et al., 1994; Martínez-Fernández et al., 2020; Merelo et al., 2022; Reid, 1980; Wuest et al., 2016).

Uno de los estudios más sistemáticos sobre la fisiología de la parada proliferativa de *Arabidopsis* fue el realizado por Hensel et al., en 1994, donde se acuñó el término GPA. En este estudio mostraron que en la inducción del GPA, eran las semillas, y no solo los frutos, el factor más determinante. Observaron que las plantas con baja fertilidad tienen una fase reproductiva y un tiempo de vida más largo. Además, observaron que existía un efecto umbral, ya que la extensión en la fase reproductiva solo se observaba cuando la producción de semillas caía por debajo del 30% respecto al silvestre (completamente fértil) en sus condiciones experimentales. Propusieron que las semillas envían algún tipo de señal que regula la actividad de los meristemas y que al suprimir esta señal eliminando los frutos la parada se puede revertir, activando el meristemo que produce nuevamente flores. Este estudio demostró que la parada del meristemo puede estar también bajo control genético, y exploró la posible contribución de hormonas conocidas en ese momento al proceso, pero no llegó a identificar esta “hormona de la muerte”.

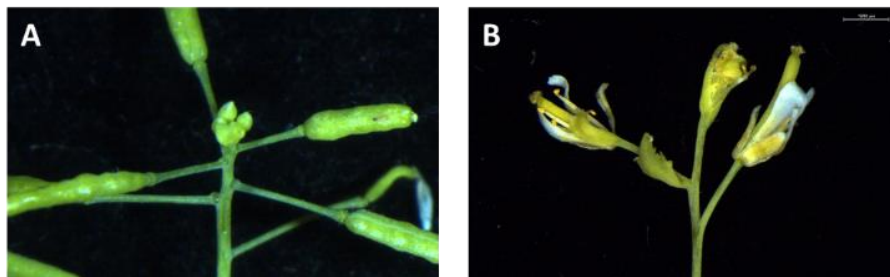


Figura 1.2. La eliminación de frutos produce una flor indeterminada. (A) Ápice inflorescente principal tras la parada proliferativa sin ningún tratamiento. **(B)** Ápice inflorescente principal tras haber eliminado todos los frutos producidos a lo largo del desarrollo, formando una flor indeterminada final.

Como mencionamos previamente, recientemente Ware et al., en 2020, propusieron que la parada de la floración no es sincrónica si no que se alarga hasta 5 días desde la parada del meristemo apical, dependiendo en cada caso de los frutos de cada inflorescencia secundaria o coflorescencia de manera independiente. Además, propusieron que la señal producida por los frutos no ejercía su efecto inhibitor en la actividad del meristemo hasta que éste no adquiere la competencia para detenerse, posiblemente determinada por su edad, siendo los frutos más próximos al meristemo los que tienen una influencia mayor. Por último, sugirieron que las auxinas procedentes de los frutos en desarrollo son una señal importante implicada en la parada del meristemo, cuando es competente para hacerlo, aunque no aportaron datos sobre cual podría ser el mecanismo por el cual lo hacen.

Mantenimiento de la indeterminación del meristemo.

Nuestro interés en este trabajo es centrarnos en el estudio de la genética que rodea la parada de la floración en *Arabidopsis*. Para ello, es importante conocer las rutas implicadas en el mantenimiento de la indeterminación del meristemo inflorescente (MI). En este proceso están involucradas complejas redes de regulación en las que participan factores de transcripción, microRNAs, péptidos pequeños, hormonas, enzimas y marcas epigenéticas (Bustamante et al., 2016).

Las rutas genéticas que mantienen el MI indeterminado han sido ampliamente estudiadas en *Arabidopsis*, siendo el bucle *WUSCHEL (WUS)* – *CLAVATA (CLV)* el que mantiene el número de células madre en el meristemo (Jha et al., 2020), mientras que *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* evita que las células se diferencien en exceso. Ambas rutas son independientes, pero poseen funciones complementarias (Lenhard et al., 2002). La pérdida de *WUS* y *STM* supone la desaparición de los meristemos (Laux et al., 1996; Long et al., 1996).

El gen *WUS* codifica un factor de transcripción con homeodominio perteneciente a la familia *WOX* (*WUSCHEL*-like homeobox), que es específico de plantas (Haeckel et al., 2004; Jha, 2020; Kieffer et al., 2006). Su expresión está limitada a un pequeño número de células en el centro del meristemo (Jha et al., 2020; Mayer et al., 1998; Yadav et al., 2011). *WUS* promueve la expresión de *CLAVATA3 (CLV3)* en las células madre (Jha et al., 2020; Schoof et al., 2000) y *CLV3* a su vez se une a los receptores *CLV1/CLV2/CORYNE* para reprimir a *WUS*, manteniendo la proporción correcta de células madre en el meristemo (Brand et al., 2000; Jha et al., 2020; Müller et al., 2008; Schoof et al., 2000).

El gen *STM* en cambio codifica una proteína homeodominio de clase *KNOTTED* (Long et al., 1996). *STM* se expresa en todo el meristemo, permitiendo que las células de la zona periférica y medular se mantengan desdiferenciadas y proliferativas (Lenhard et al., 2002).

En el momento de la parada de la floración, la actividad de *WUS* deja de ser detectable en el centro del meristemo (Balanzà et al., 2018, Goetz et al., 2021; Merelo et al., 2022), aunque la división celular se reduce antes de la represión total de *WUS* (Merelo et al., 2022). Contrariamente a *WUS*, sí que se observa expresión de *CLV3* y *STM* en los meristemos parados, indicando que hasta que la inflorescencia entra en senescencia existen células madre presentes en el meristemo (Balanzà et al., 2018; Goetz et al., 2021; Wang et al., 2020). A pesar de actuar en rutas mayormente independientes, se ha observado que *WUS* y *STM* en conjunto son necesarios para aumentar la expresión de *CLV3* después

de la embriogénesis (Brand et al., 2002), pero de momento no se conocen factores que puedan explicar que se mantenga la expresión de *CLV3* en ausencia de WUS.

Al reactivar los meristemas tras la eliminación de frutos, se puede observar que la actividad de WUS se restablece (Merelo et al., 2022), promoviendo el desarrollo de nuevos primordios y activando la división celular.

La ruta FUL/AP2

Como se ha comentado anteriormente, varios trabajos propusieron que la parada de la proliferación debía estar regulada por alguna ruta genética probablemente dependiente de la edad, y que podría tener relación con la adquisición de la competencia para frenar la actividad del meristemo propuesta por Ware et al., en 2020. Una de las evidencias que apoyaban esta idea era la observación de que, dependiendo del ecotipo de *Arabidopsis* caracterizado, el momento de la parada y la producción de frutos totales era diferente y característica de cada genotipo (Hensel et al., 1994). Estudios posteriores identificaron la primera ruta genética involucrada en el control de la parada de la floración: la ruta FUL/AP2 (Balanzà et al., 2018).

FRUITFULL (*FUL* o *AGL8*) codifica un factor de transcripción de tipo MADS-box relacionado con el establecimiento de la identidad del meristemo floral, el control del tiempo de floración y el desarrollo del carpelo y el fruto (Balanzà et al., 2014; Ferrándiz et al., 2000a,b; ; Gu et al., 1998; Hempel et al., 1997; Mandel y Yanofsky, 1995).

La función más estudiada de *FUL* es su papel en el desarrollo del fruto en *Arabidopsis*, donde tiene un papel clave en el establecimiento de las zonas de margen de valva (Balanza et al., 2006; Dinneny et al., 2005; Girin et al., 2009). Otra función estudiada de *FUL* es su rol en el establecimiento de la identidad del meristemo floral redundantemente con *APETALA 1* (*API*) y *CAULIFLOWER* (*CAL*) (Ferrándiz et al., 2000^a; Mandel y Yanofsky, 1995). En los primeros estadios del desarrollo floral *API* reprime la expresión de *FUL* en el meristemo floral (Mandel y Yanofsky, 1995), y al mutar *API* la expresión de *FUL* ocupa su lugar (Ferrándiz et al., 2000a). La mutación de ambos genes (*API* y *FUL*) aumenta la pérdida de identidad floral, por lo que se considera que *FUL* puede compensar la falta de *API* en el meristemo floral parcialmente (Ferrándiz et al., 2000a). También se ha estudiado el papel de *FUL* en el tiempo de floración, donde actuaría como un promotor de ésta (Ferrándiz et al., 2000a,b; Gu et al., 1998), siendo regulado ya sea por la ruta del fotoperiodo como por la ruta de la edad (Ver siguiente apartado “Antes de la ruta FUL/AP2: Los genes SPL”).

APETALA2 (AP2) codifica un factor de transcripción de tipo AP2-like que, dentro de esta familia, forma un clado con otros cinco genes con los que comparte regulación por el miR172 y puede actuar tanto como activador como represor (Yant et al., 2010). La función de AP2 está relacionada con múltiples procesos del desarrollo de la planta, especialmente relacionados con las flores: el desarrollo de sépalos y pétalos, la transición floral o el desarrollo de la semilla y del meristemo floral y el mantenimiento de sus células madre (Aukerman y Sakai, 2003; Drews et al., 1991; Jofuku et al., 1994, 2005; Würschum, 2006). El papel de AP2 en el mantenimiento de las células madre del meristemo se descubrió a partir de una mutación dominante negativa de este gen, en la que se observaba un defecto en el mantenimiento del meristemo apical. Se propuso que AP2 podía estar relacionado en el control de los niveles de *WUS*, favoreciéndolo a través de la regulación del ciclo WUS-CLV3 (Würschum et al., 2006). Recientemente se ha propuesto que FUL y el miR172 podrían mediar conjuntamente la regulación de los genes *AP2-like* en la floración, tras ser inducidos por SPL15 (Ó'Maoiléidigh et al., 2021).

Un estudio realizado por Balanzà et al. en 2018 se centró en la caracterización de los mutantes del gen *FUL* en *Arabidopsis* en relación con la duración de la fase reproductiva. Los mutantes *ful* producen más frutos que las plantas silvestres y alargan la fase reproductiva, y este efecto no depende del fondo genético (el ecotipo) ni del número de semillas producidas. El aumento en el número de frutos de los mutantes *ful* se debe al retraso en la parada de la proliferación: llega un punto donde Col-0 deja de producir frutos mientras *ful-2* continúa, aunque a un ritmo menor. Además, en los mutantes *ful-2* el meristemo no detiene su actividad por completo ni se diferencia en una flor terminal (**Fig. I.3**), mientras su sobreexpresión produce el efecto contrario (Balanzà et al., 2014, 2018; Merelo et al., 2023). De hecho, la mutación *ful* es capaz de suprimir la formación de la flor terminal en todos los fondos mutantes estériles en los que se ha caracterizado, como por ejemplo *ap2* y 35S:miR172 (Balanza et al., 2019).

Se ha demostrado que FUL regula directamente y de forma negativa a *AP2* y otros miembros del clado, y que tanto la regulación negativa de FUL como la del miR172 hace que la actividad de AP2 en el SAM inflorescente disminuya y con ella la de WUS. Los meristemos en parada proliferativa pueden reactivarse induciendo a *AP2* y además, la reducción de los niveles de los genes *AP2-like* mediante la sobreexpresión del miR172 suprime el fenotipo de *ful* en la parada de la floración.

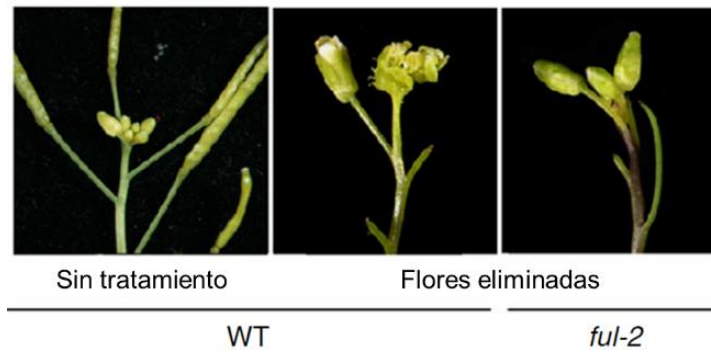


Figura I.3. La mutación del gen *FUL* no produce flor terminal. Al realizar un tratamiento de poda en la inflorescencia principal de *Arabidopsis*, las plantas Col-0 producen una flor terminal mientras el mutante *ful-2* no. Imagen tomada de Balanzà et al., 2018.

Por último, la inducción de *AP2* es suficiente para reactivar un meristemo inflorescente parado (Fig. I.4), y por otro lado, la sobreexpresión del miR172 suprime el retraso de la parada meristemática en el mutante *ful-2*, limitando el número de frutos producidos; todo ello indica que los genes del clado *AP2*-like que son dianas del miR172 son necesarios y muy relevantes para la regulación de la parada de la floración.



Figura I.4. La inducción de *AP2* recupera la actividad del meristemo. Al inducir la versión resistente a miR172 *AP2*¹⁷⁰ en un meristemo parado, este meristemo es capaz de reactivarse y volver a producir flores. Imagen tomada de Balanzà et al., 2018.

Se ha propuesto un posible modelo para el control de la parada proliferativa mediado por la ruta *FUL*-*AP2* (Fig. I.5). Al aumentar los niveles de *FUL* y del miR172 a lo largo del desarrollo de las plantas, disminuiría la actividad de los genes *AP2*-like, disminuyendo a su vez los niveles de *WUS* y causando la parada de la floración, probablemente de modo independiente de la posible señal de las semillas propuesta por Hensel et al. en 1994. En este modelo se hace mención también de la posible función de los genes *SPL* dianas del miR156 en la regulación de *FUL*, que ha sido ya descrita durante la fase vegetativa (Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009), pero no caracterizada en la fase reproductiva y, por tanto, su posible participación en la ruta genética que controla la parada de la proliferación en las plantas.

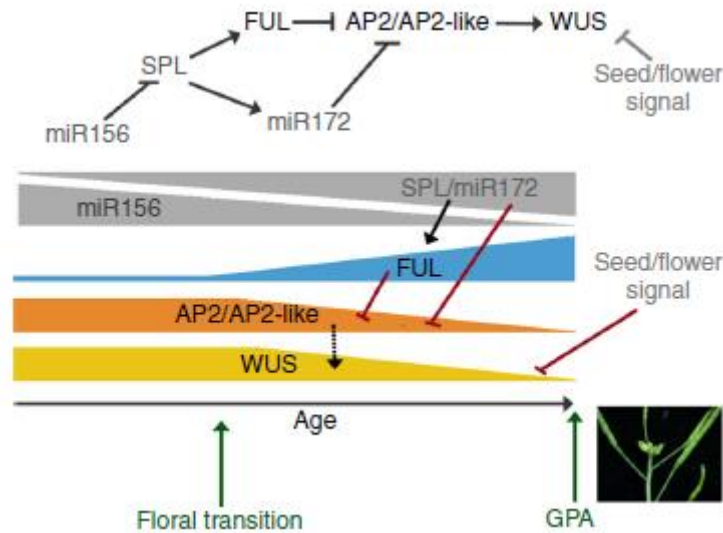


Figura I.5. Modelo de la ruta FUL-AP2. Al final del ciclo vital de *Arabidopsis* la reducción del miR156 y aumento de los *SPL* permite que aumente la expresión del miR172 y *FUL*. El aumento de *FUL* y miR172 reduce los niveles de *AP2* ocasionando un descenso en los niveles de *WUS* y por tanto de la actividad del meristemo, de manera independiente a la señal derivada de las semillas. Imagen tomada de Balanzà et al., 2018.

Antes de la ruta FUL/AP2: Los genes *SPL*

Se conoce poco sobre qué factores controlan la acumulación de *FUL* durante la fase reproductiva, ya que los estudios publicados se han centrado principalmente en su papel durante la transición floral.

Durante la transición floral la ruta dependiente de fotoperiodo se activa cuando *FLOWERING LOCUS T (FT)* se trasloca desde las hojas al ápice, donde interacciona con *FD* y activa a *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*. La acción conjunta de *FT/FD* y *SOC1* produce la activación de *LEAFY (LFY)*, *AP1* y *FUL*, que a su vez se activan mutuamente y regulan negativamente a *SOC1*, promoviendo la producción de meristemos florales (Amasino, 2010; Skrikanth y Schmid, 2011).

Por otra parte, la transición floral también está controlada por una ruta dependiente de la edad, donde el miR156 disminuye su expresión mientras los genes *SPL* regulados por él, como *SPL3*, *SPL4*, *SPL5* o *SPL9*, aumentan su expresión (Cardon et al., 1999; Schmid et al., 2005; Wu et al., 2006). Las proteínas *SPL3*, *SPL4* y *SPL5* interaccionan con *FD* y son capaces de unirse a los promotores de los genes *LFY*, *AP1* y *FUL*, activándolos gracias a esa interacción (Jung et al., 2016; Yamaguchi et al., 2009). *SPL9*, por otra parte, es un regulador directo de *FUL* y *AP1* y también se ha propuesto a *SOC1* como una posible diana directa (Wang et al., 2009). Además, los genes *SPL9* y *SPL10* promueven redundantemente la expresión de miR172 activando su transcripción directamente y

reduciendo en consecuencia los niveles de *AP2* y otros miembros de la familia *AP2*-like (Mathieu, 2009; Wu et al., 2009)

Ambas rutas, la del fotoperiodo y la de la edad, convergen promoviendo la transición floral, siendo *FT/FD* y los genes *SPL* los que determinan la identidad de la inflorescencia y el meristemo floral a través de *LFY*, *AP1* y *FUL* (Huijser y Schmid, 2011). Sin embargo, poco se conoce sobre sus posibles funciones después de la transición floral y, en particular, qué papel pueden tener los genes *SPL* que no son regulados por miR156 en el desarrollo. Una hipótesis posible es que los genes *SPL* también regulen la parada proliferativa.

Los genes *SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* son una familia de factores de transcripción (SBP)-box. Esta familia de genes está ampliamente conservada en el reino vegetal desde algas y musgos hasta especies de interés agronómico como la cebada, arroz, trigo o fresas (Fig. I.6; Guo et al., 2008; Jiang et al., 2021; Preston et al., 2013; Tripathi et al., 2018). La secuencia consenso a la que se unen los factores de transcripción fue descrita por Cardon et al. en 1999, siendo ésta “-T-CGTACAA”. El dominio de unión al DNA se denomina dominio SBP y tiene aproximadamente 79 aminoácidos, con un motivo *zinc-finger* con dos sitios de unión Zn²⁺: Cys-Cys-His-Cys y Cys-Cys-Cys-His (Yamasaki et al., 2004).

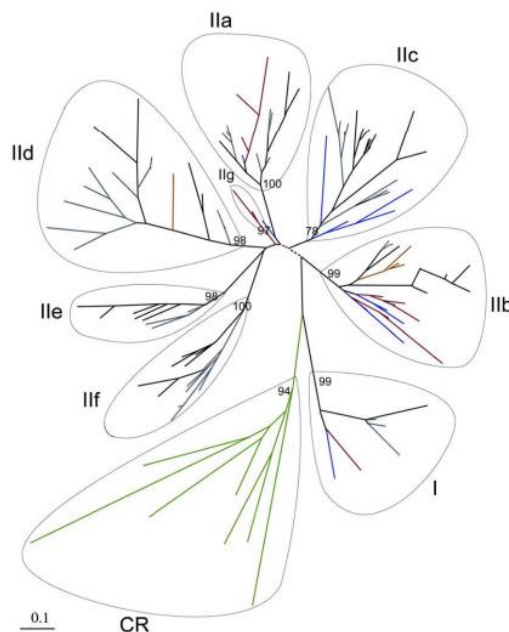


Figura I.6. Árbol sin enraizar de 120 dominios SBP generado por *máximum-likelihood*. Los colores indican los diferentes linajes: verde, algas verdes; rojo, musgo; azul, licofitos; marrón, gimnospermas; negro, monocotiledóneas; gris, dicotiledóneas. Imagen tomada de Guo et al., 2008.

En *Arabidopsis*, la familia de factores de transcripción *SPL* está formada por 16 miembros, de los cuales 10 están regulados por el miR156 (Fig. 7A; Gandikota et al., 2007; Rhoades et al., 2002, Shwab et al., 2005; Wu et al., 2006). Los genes *SPL* en *Arabidopsis* están implicados en la regulación de múltiples procesos: desarrollo de hojas, transición de

fase, desarrollo de flores y frutos, arquitectura de la planta, señalización de giberelinas, biosíntesis de antocianinas, respuesta a cobre o toxinas fúngicas, entre otras (Chen et al., 2010; Gou et al., 2011; Stone et al., 2005; Yu et al., 2010). Se ha propuesto que los factores SPL sean una herramienta útil para mejorar la producción de cultivos de interés agronómico ya que participan en funciones clave como la maduración del tomate, la tuberización de la patata, el tamaño y cantidad del grano en arroz y la ramificación y en la formación de la lígula y la aurícula en maíz, arroz y cebada (Wang et al., 2015a)

Como hemos mencionado previamente, el papel de los genes *SPL* es especialmente interesante en la transición floral. Se ha observado que a lo largo de la fase vegetativa de *Arabidopsis*, los niveles de miR156 se reducen, mientras que los de los genes *SPL* regulados por estos miRNAs aumentan, permitiendo el cambio de fase de vegetativa a reproductiva de manera independiente a la ruta FT/FD (Wu et al., 2006; Wang et al., 2009). Los genes *SPL2/9/10/11/13/15* son capaces de controlar el tamaño del meristemo reprimiendo a *WUSCHEL*, probablemente a través de la regulación de miR172 y por tanto de la familia AP2/AP2-like (Fouracre et al., 2019), y se ha propuesto también que SPL4 pueda formar un bucle de retroalimentación negativa con WUS (Musialak-Lange et al., 2021). Además, como se comentó anteriormente, los miembros de la familia *SPL3/4/5/9* han sido descritos como reguladores positivos de *FUL* durante la transición floral o participando en el proceso de maduración de hojas (Chen et al., 2010; Yamaguchi et al., 2009; Xu et al., 2016), donde los genes *SPL3*, *SPL4* y *SPL5* se unen directamente a *FUL*, *LFY* y *API* promoviendo su expresión, haciendo posible el paso de fase de la vegetativa a la reproductiva (Jung et al., 2016; Yamaguchi et al., 2009). Este último hecho nos hizo valorar la posibilidad de que los genes *SPL* tengan una función regulando a *FUL* también en la parada de la proliferación.

Solo seis genes de la familia SPL de *Arabidopsis* no son regulados por el miR156: *SPL1*, *SPL7*, *SPL8*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16*. Todos ellos están cercanos filogenéticamente, y los genes *SPL1*, *SPL12*, *SPL14*, *SPL16*, además de formar parte del mismo clado (Chen et al., 2010), están expresados constitutivamente y codifican las proteínas más complejas de la familia de los *SPL* donde además del dominio SBP con señal de localización nuclear en N-terminal que define la familia, poseen de manera particular un dominio ANQ/ANQ2 responsable mediar interacciones proteína-proteína, y un dominio transmembrana en C-terminal (**Fig. I.7B**; Chao et al., 2017; Chen et al., 2010; García-Molina et al., 2014).

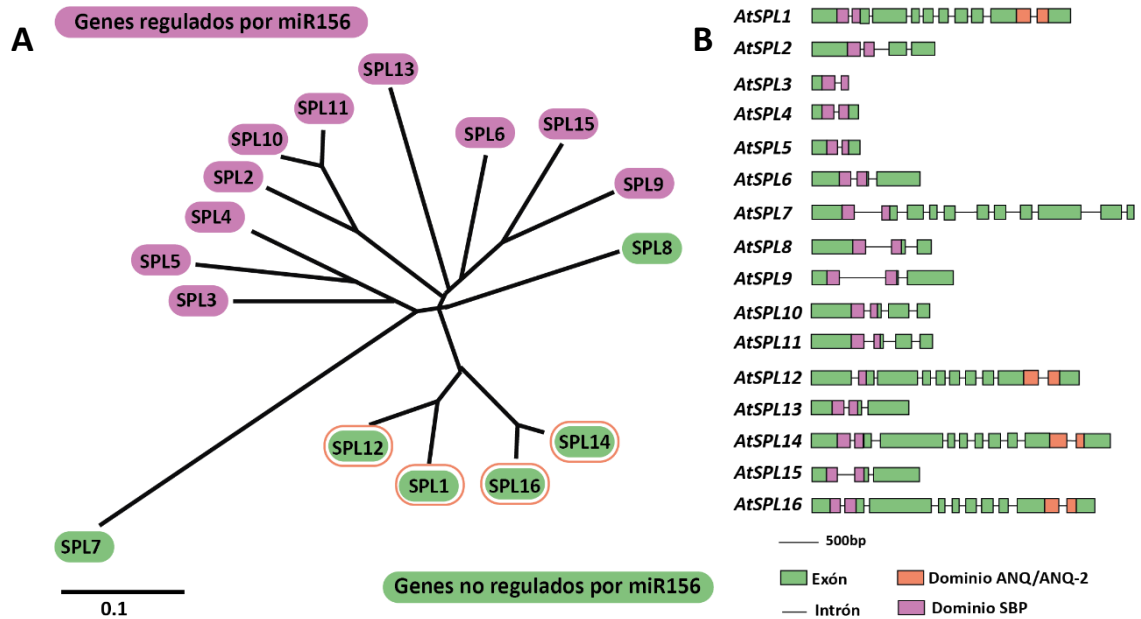


Figura 1.7. Los genes *SPL* de Arabidopsis. (A) Relación filogenética de los genes *SPL*, encuadrado en morado están los genes *SPL* regulados por miR156 y en verde los genes *SPL* no regulados por miR156. Redondeados en naranja los genes *SPL* con dominio de anquirina. (B) Estructura de los genes *SPL* incluyendo exones (verde), intrones (línea) y dominios SBP (morado) y ANQ/ANQ2 (naranja). Los genes *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16* forman un clado y son los únicos que poseen el dominio ANQ/ANQ2. Imágenes adaptadas de Bouché et al., 2016; Xing et al., 2010, y Zhang et al., 2014.

Hay pocos estudios publicados sobre la función de estos genes en Arabidopsis. Uno de ellos estudió el efecto de la mutación de *SPL1* y *SPL12* en la termotolerancia de las inflorescencias. El estrés por calor afecta más severamente al desarrollo durante la etapa reproductiva y especialmente a las flores. *SPL1* y *SPL12* parecen ser necesarios para producir una respuesta al estrés por calor a través de la señalización de ABA, siendo el mutante *sp1 sp12* más sensible al calor (Chao et al, 2017). En este estudio también se describe que el doble mutante *sp1 sp12* tiene una reducción en la fertilidad tanto en la proporción de frutos que llegaban a desarrollarse como en las semillas que contenía cada uno de los frutos desarrollados (Chao et al., 2017; Schulten et al., 2019). En cuanto al gen *SPL14*, sólo existe un estudio realizado por Stone et al. en 2005, donde se describe un mutante del gen *SPL14* con mayor resistencia a la toxina fúngica Fumonicina B1. Lo más interesante en lo que respecta a este trabajo es que Stone et al. notaron que el mutante *sp14* tiene adelantada la transición floral, en contraposición a lo observado para la mayoría de los mutantes *sp/* anteriormente estudiados, que indican que los factores SPL actúan generalmente como promotores de la floración.

Para saber si los genes SPL podrían tener un papel en la parada proliferativa, partimos del análisis de los sets de datos publicados por Wuest et al. (2016) comparando meristemas apicales activos con meristemas que han parado de proliferar. Al analizar estos

datos, encontramos que entre todos los genes *SPL*, sólo el subclado de genes *SPL* con dominios anquirina (*SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16*, a partir de aquí denominados *SPL-ANQ*) se acumulaban en meristemos parados (Fig. I.8A), al igual que ocurre con *FUL*. Además, Patricia Ballester (2016) observó mediante ensayos *in vivo* de activación transitoria del promotor de *FUL* fusionado a *LUCIFERASA* (*LUC*) que, cuando se coinfiltraba *FULpro::LUC* con *35S::SPL1* o *35S::SPL14*, se detectaba más actividad *LUC* (Fig. I.8B). Estos resultados sugieren que los factores *SPL-ANQ* son posibles reguladores directos de *FUL*, y que estos genes podrían tener un rol regulando la expresión de *FUL* durante la fase reproductiva.

Estas observaciones nos hicieron plantear la hipótesis de que los genes *SPL-ANQ* podrían estar regulando a *FUL* aguas arriba de la ruta *FUL-AP2* y así participar en el control de la parada proliferativa. El primer objetivo de esta tesis fue por tanto averiguar cuál es la relación que pueden tener el clado de genes *SPL-ANQ* con *FUL* en este contexto.

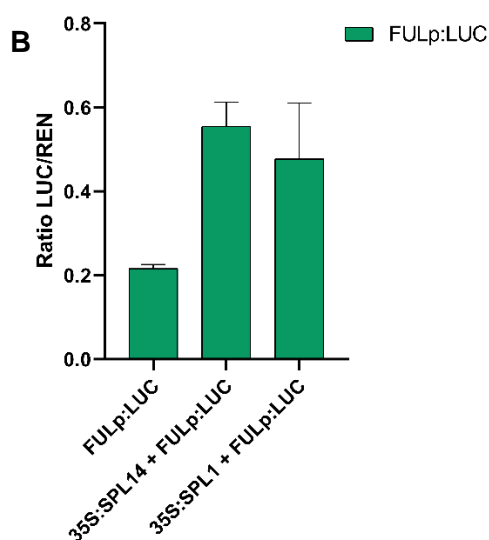
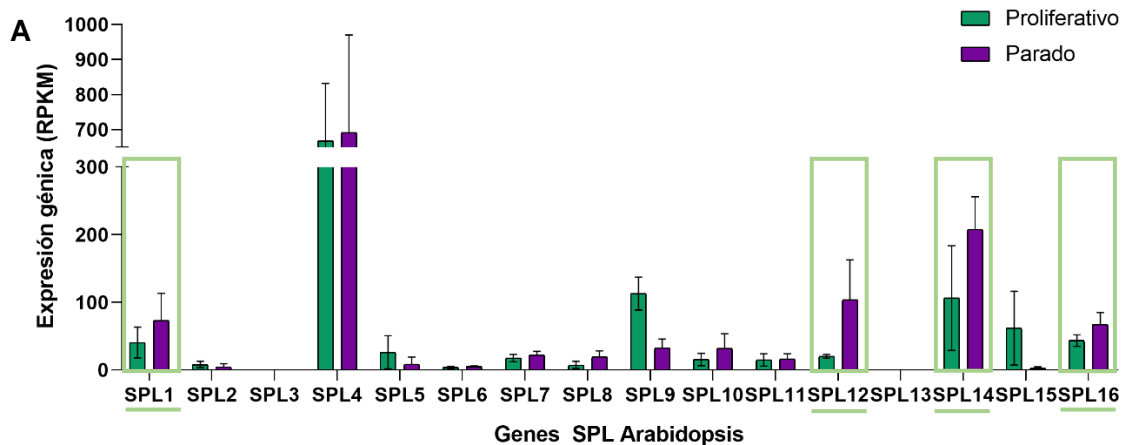


Figura I.8. Los genes *SPL-ANQ* se expresan al final de la proliferación y pueden activar el promotor de *FUL* (A) Expresión génica de los genes *SPL* en meristemos activos y meristemos parados. Los genes *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16*, a diferencia del resto, aumentan cuando el meristemo está detenido. Figura adaptada de Wuest *et al.*, 2016. (B) Activación transitoria del promotor de *FUL* por las proteínas *SPL14* y *SPL1*. Se observa el ratio *LUC/REN* cuantificado en hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con los plásmidos indicados en la gráfica. Se observa un aumento en la expresión cuando se combina *FULpro:LUC* con los vectores *35S:SPL1* y *35S:SPL14*. Figura adaptada de Ballester, 2016.

Después de la ruta FUL/AP2: dormancia, ácido abscísico y genes *HB*.

Una vez establecido el papel del módulo FUL/AP2 en el control del fin de la floración por Balanzà et al. en 2018, se ampliaron estos estudios mediante la identificación de otros elementos que actuaran aguas abajo de esta ruta controlando la parada de la proliferación.

Para entender mejor las bases moleculares involucradas en la parada de la proliferación, y previamente al trabajo de Balanzà et al, 2018, se había realizado un análisis transcriptómico en meristemas inflorescentes de *Arabidopsis* comparando plantas en crecimiento y en floración activa, plantas que habían detenido su crecimiento, es decir, en parada proliferativa, y plantas con la producción de flores reactivada tras la eliminación de todos los frutos (Wuest et al., 2016). El perfil transcriptómico de los meristemas en crecimiento y los reactivados es muy similar, mientras que el perfil de los meristemas detenidos cambia mucho. Una de las diferencias más notables es que la expresión de los genes relacionados con la progresión del ciclo celular es baja en los meristemas parados y alta en los meristemas en crecimiento, lo que sugiere que la parada del meristemo pasa por una etapa de latencia o quiescencia mitótica previa a la senescencia. También cabe destacar que los meristemas en parada proliferativa tienen una expresión comparativamente alta de genes previamente asociados con la dormancia de las yemas axilares, así como de genes de respuesta a estrés y las respuestas de señalización por ABA (Wuest et al., 2016).

Un estudio similar realizado por Martínez-Fernández et al. en 2020, analizó la respuesta de los meristemas inflorescentes a la inducción de *AP2*, identificado como represor de la parada proliferativa (Balanzà et al., 2018). El análisis transcriptómico comparativo de meristemas cercanos a la parada proliferativa y meristemas con la expresión de *AP2* inducida muestra que estos últimos responden a nivel transcriptómico de un modo similar a los reactivados por poda de los frutos del experimento de Wuest en 2016 (**Fig. 1.9A**). Cabe destacar que, tras la inducción de *AP2*, entre los genes diferencialmente expresados se encuentran sobrerrepresentados varios relacionados con la biosíntesis, percepción, señal y respuesta a ABA, incluyendo los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* (Martínez-Fernández et al., 2020). Por tanto, este trabajo propuso que *AP2* podría estar controlando la parada de la proliferación mediante la represión de genes relacionados con la dormancia de las yemas axilares pero en el meristemo inflorescente, incluyendo la respuesta hormonal a ABA, un componente clave en el mantenimiento de dormancia axilar (González-Grandío et al., 2017; Yao y Finlayson, 2015).

Uno de los genes identificados como posible diana de la represión por AP2 es *HB21*, que previamente había sido directamente relacionado con la ruta de biosíntesis del ácido abscísico y con la dormancia de botones laterales (González-Grandío et al., 2017). Al final de la floración, *HB21* aumenta su expresión en el momento de la parada proliferativa, aumento no detectable en inflorescencias del mutante *ful* en el mismo momento del desarrollo (Fig. I.9B, Martínez-Fernández et al., 2020). Además, este trabajo muestra que un alelo mutante de *hb21* produce un mayor número de frutos antes de la parada proliferativa (Fig. I.9C), por lo que este gen parece ser una posible diana de AP2 aguas abajo de la ruta FUL/AP2, y tener un papel en la regulación de la parada proliferativa, un aspecto que pretendemos explorar en esta tesis.

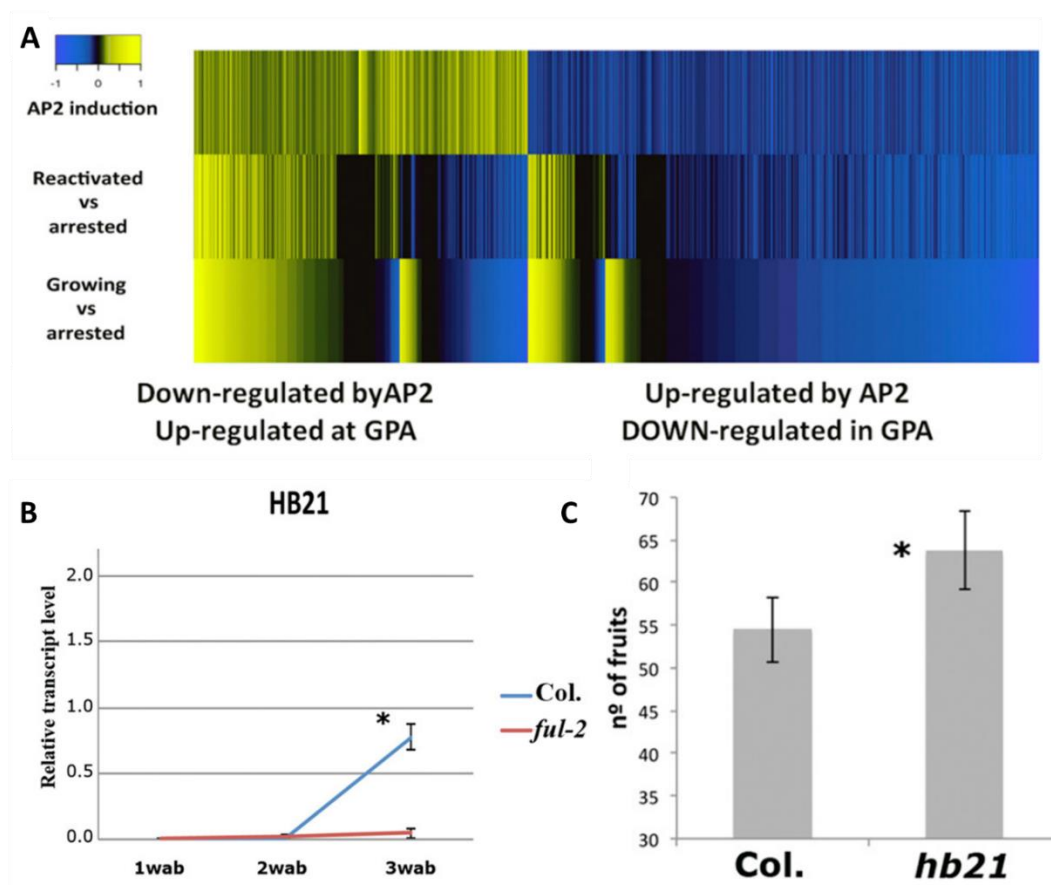


Figura I.9. Respuesta a la inducción de AP2 en el meristemo inflorescente (A) *Heatmap* de los genes diferencialmente expresados en la inducción de AP2 y en la comparación de meristemos en crecimiento o reactivados frente a meristemos parados. Los genes se expresan de forma similar en las tres situaciones. **(B)** La expresión de *HB21* aumenta al final de la floración en Col-0, mientras que en el mutante *ful* la expresión no aumenta. **(C)** El número de frutos producidos por el mutante *hb21-2* es mayor que el número de frutos producidos por Col-0. Figura modificada de Martínez-Fernández et al., 2020.

El gen *HB21* pertenece a la familia “homeodomain-leucine zipper” (HD-ZIP) de factores de transcripción. Esta familia de factores de transcripción es específica de plantas

y en *Arabidopsis* está compuesta por 48 proteínas diferentes divididas en cuatro clases. Los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* pertenecen a la clase I (Fig. I.10; Roodbarkelari y Groot, 2016; Tang et al., 2019).

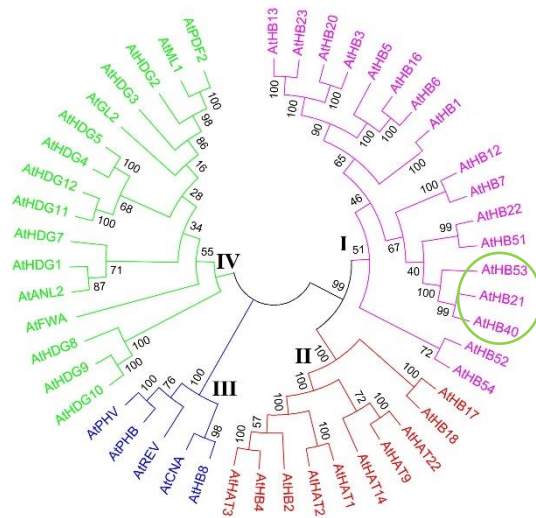


Figura I.10. Árbol filogenético de la familia HD-ZIP en *Arabidopsis*. Los genes se dividen en cuatro clases, mapa realizado usando el método de neighbour-joining. Redondeados están los genes *HB21*, *HB40* y *HB53*. Imagen modificada de Tang et al., 2019.

Las proteínas HD-ZIP de clase I se unen a la secuencia de DNA AAT(N)ATT (Perotti et al., 2017) y están relacionadas con la respuesta a ácido abscísico, respuesta a estrés abiótico, desarrollo de hojas y expansión celular (Perotti et al., 2017; Roodbarkelari et al., 2016). A pesar de que muchos genes de esta familia se han caracterizados funcionalmente y se conoce bien donde se expresan o las condiciones que los inducen (Fig. I.11), sobre los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* los estudios publicados son comparativamente más escasos (Perotti et al., 2017)

Un estudio realizado por González-Grandío et al. en 2016 describió que los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* se expresaban en las yemas axilares de la roseta y que sus mutaciones aumentaban la ramificación de estas plantas en condiciones de luz suplementadas con rojo lejano, implicando que estos genes estarían involucrados en el mantenimiento de la dormancia de las yemas axilares. Estos tres factores transcripcionales inducían de modo redundante la expresión de *9-CIS-EPOXICAROTENOID DIOXIGENASE 3* (*NCED3*), gen responsable de la biosíntesis de ácido abscísico (González-Grandío et al., 2016). Además, los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* son reprimidos por la inducción de *AP2* (Martínez-Fernández et al., 2020).

La evidencia que aportan estos trabajos indica que los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* podrían ser importantes componentes de la ruta genética que controla el final de la floración e implica al módulo FUL/AP2, aunque sus funciones concretas y el grado en el que contribuyen a la parada proliferativa de los meristemas son aún poco conocidas. Por ello, el segundo objetivo de esta tesis será comprobar si los genes *HB21*, *HB40* y *HB53*

podrían estar trabajando aguas abajo de *AP2*, de forma que podamos ampliar nuestros conocimientos sobre la ruta FUL/*AP2*.

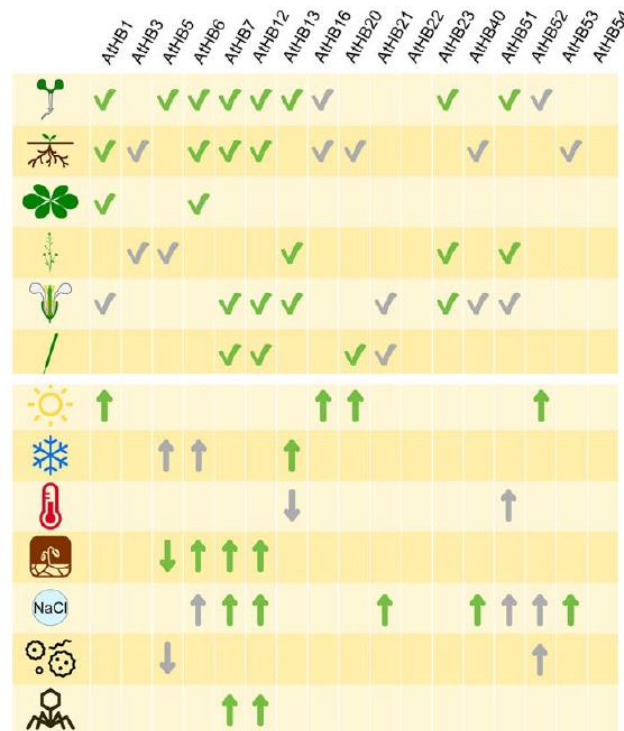


Figura I.11. Expresión de los genes HD-ZIP I en Arabidopsis. Figura realizada en base a los datos publicados relacionando la expresión a órganos y respuestas a tratamientos exógenos. El panel de arriba muestra la expresión de estos genes en los distintos tejidos (plántula, raíces, roseta, planta adulta, flor, silicua), el de abajo en diferentes condiciones y estímulos (luz, frío, calor, sequía, salinidad, bacterias, virus). ✓, evidencia de expresión; flecha hacia arriba, inducción; flecha hacia abajo, represión. En verde están los datos respaldados por publicaciones, en gris los respaldados por bases de datos. Imagen tomada de Perotti et al., 2017.



OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de las rutas genéticas implicadas en el control de la parada de la proliferación de *Arabidopsis thaliana*. Así, como objetivos concretos planteamos:

1. Identificar y caracterizar la función de nuevos elementos aguas arriba de la ruta FUL/AP2: los genes *SPL* con dominios anquirina.
2. Identificar y caracterizar la función de nuevos elementos aguas abajo de la ruta FUL/AP2: los genes *HB21*, *HB40* y *HB53*.
3. Ampliar el modelo genético que determina la parada de la floración en *Arabidopsis thaliana*.

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned in the lower right quadrant of the page. The colors are blended and soft-edged, creating a painterly effect.

CAPÍTULO 1

Los genes *SPL-ANQ* comparten patrón de expresión con *FUL*

Aunque los resultados de los experimentos de activación transitoria del promotor de *FUL* indicaban que los factores *SPL1* y *SPL14* pueden unirse a dicho promotor y activarlo, faltaba comprobar si esto también ocurría en la planta y si tenía una posible función biológica. En primer lugar, realizamos experimentos para mostrar si *FUL* y los genes *SPL-ANQ* compartían los mismos patrones de expresión. Una de las herramientas que se han empleado tradicionalmente para estudios de expresión es el análisis de líneas reporteras. Nos propusimos entonces ver el patrón de expresión de los genes *SPL* y compararlo con el patrón de expresión de *FUL*, utilizando para ello la actividad del marcador *GUS*. Si *SPL* es un regulador de *FUL* in vivo esperaríamos que sus patrones de expresión fueran solapantes.

Para ello se utilizó por un lado la línea reportera *FULpro::GUS* que ya había sido descrita previamente (Bemer et al., 2017), y por otro lado líneas reporteras generadas en este trabajo para el estudio de la expresión de los genes *SPL*.

El gen *FUL* se expresa ampliamente a lo largo de todo el desarrollo de *Arabidopsis* (Bemer et al., 2017; Gu et al., 1998), especialmente en hojas caulinares, flores y meristemas. La tinción de las líneas *FULpro::GUS* crecidas en nuestras condiciones experimentales mostró un patrón similar al descrito, pudiéndose observar como efectivamente se detectaba señal en las valvas del gineceo de flores en anthesis (**Fig. C1.1A**), el centro de las yemas florales (**Fig. C1.1B**) y el meristemo apical de la inflorescencia (**Fig. C1.1B**, asterisco).

Se obtuvieron de manera satisfactoria construcciones reporteras del gen *GUS* bajo el control de los promotores de *SPL1* y *SPL16*. Para ello, se fusionó toda la región intergénica en 5' y la correspondiente a la 5'UTR de cada uno de estos genes con la secuencia codificante del gen *GUS*, obteniendo las líneas *SPL1pro::GUS* y *SPL16pro::GUS*.

Se transformaron plantas de *Arabidopsis* silvestres Col-0 y se seleccionaron cinco líneas homocigotas con una sola inserción en la generación T₃ correspondientes a líneas transformantes independientes, que fueron las que se utilizaron para el análisis del patrón de expresión. A partir de la observación de todas estas líneas, se seleccionaron aquellas con un patrón de expresión similar y se tomó una línea de cada una de ellas para su descripción.

Ambas líneas transgénicas mostraron una actividad *GUS* fuerte. En la **Figura C1.1** podemos observar flores y meristemas de estas plantas. En el caso de la construcción *SPL1pro::GUS* la actividad *GUS* era muy fuerte en tallos, sépalos y los filamentos de los

estambres (**Fig. C1.1C**). En el gineceo, la señal parecía estar concentrada en la zona apical, incluyendo el estilo y la mitad superior de las valvas (**Fig. C1.1C**). La expresión también era muy fuerte en yemas florales y el meristemo apical (**Fig. C1.1D**). En el caso de la construcción *SPL16pro::GUS* la señal en flores se detectaba también en la zona apical del gineceo y anteras pero, a diferencia de la anterior, se observaba además en el replum (**Fig. C1.1E**). En cuanto al meristemo apical y las yemas florales la señal era muy similar a la dirigida por el promotor de *SPL1* (**Fig. C1.1F**).

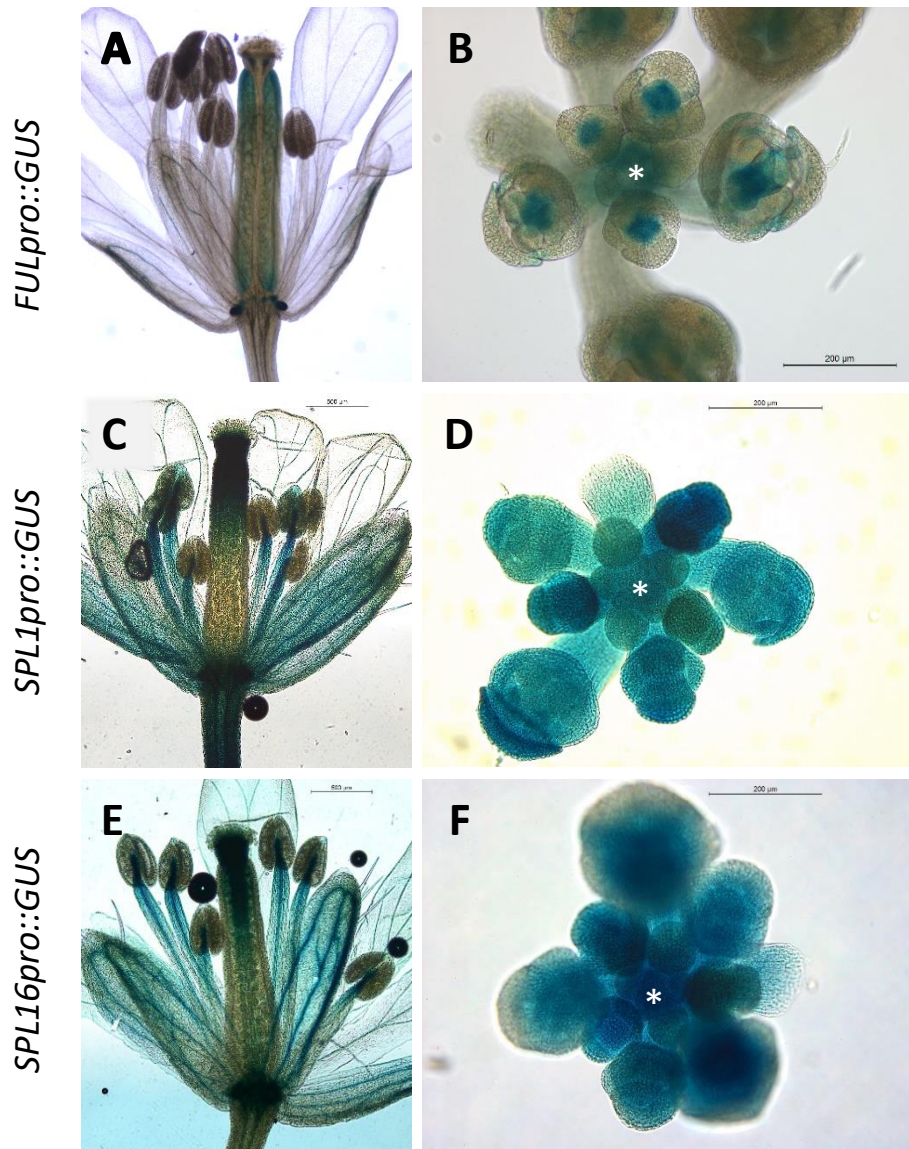


Figura C1.1. Patrón de expresión de *FUL*, *SPL1* y *SPL16*. Detección histoquímica de la actividad GUS dirigida por los promotores de *FUL*, *SPL1* y *SPL16* en inflorescencias y flores de Arabidopsis. (**A, B**) Expresión de patrón *FULpro::GUS* en flor en anthesis (**A**) y ápice inflorescente (**B**). (**C, D**) Expresión del patrón *SPL1pro::GUS* en flor en anthesis (**C**) y ápice inflorescente (**D**). (**E, F**) Expresión del patrón de expresión *SPL16pro::GUS* en flor en anthesis (**E**) y ápice inflorescente (**F**). El asterisco indica el meristemo apical del tallo. Barra de 500µm en (**A, C y E**), de 200 µm en (**B, D, F**)

Chao et al. (2017) describieron el patrón de expresión conferido por los promotores de *SPL1* y de *SPL12*, para ello generaron las líneas reporteras *SPL1pro::GUS* y *SPL12pro::GUS* utilizando 3kb aguas arriba del codón de iniciación de la traducción de estos genes. El patrón de expresión de *SPL1* descrito en esta publicación coincide con el observado en nuestros experimentos. En cuanto al patrón de expresión conferido por el promotor de *SPL12*, comparte similitudes con los patrones conferidos por *SPL1pro* y *SPL16pro* en inflorescencias, detectándose actividad GUS en el estilo, anteras y sépalos. En la publicación no se aportan datos sobre su actividad en meristemas.

Durante la realización de este trabajo no pudimos generar una línea reportadora equivalente para el gen *SPL14*, y tampoco se ha descrito el patrón de expresión del gen por otros autores. *SPL14* y *SPL16* son producto de una duplicación reciente (Guo et al., 2008) y son los genes más parecidos del clado, ya que comparten un 79,7% de identidad en la secuencia de las proteínas que codifican (Ballester, 2016). Además, *SPL1*, *SPL12* y *SPL16* tienen patrones de expresión similares. Por lo tanto, consideramos probable que *SPL14* también se exprese de un modo similar, algo que también apoya el hecho de que su expresión aumente en la parada proliferativa (ver Introducción) al igual que la de los parálogos mencionados, aunque sería necesario comprobarlo con más experimentos.

Estos datos en conjunto indican que los genes *SPL* del clado que hemos estudiado comparten en gran medida su dominio de expresión, coincidiendo en la zona apical del gineceo y el meristemo apical en plantas de *Arabidopsis*. Al comparar estas zonas con el patrón de expresión de *FUL*, observamos que en el meristemo son solapantes, pero en el gineceo sólo coinciden en la zona apical de las valvas. Estos datos indican que en el meristemo los genes *SPL* y *FUL* se coexpresan y por tanto nuestra hipótesis es plausible.

Por otro lado, decidimos comprobar también cuál era el patrón de acumulación de las proteínas codificadas por estos genes, centrándonos en *SPL16*. Para ello se realizó la fusión traduccional de la región codificante de *SPL16* a la secuencia codificante de la *YFP*, bajo su propio promotor (*SPL16pro::SPL16-YFP*). Obtuvimos seis líneas homocigotas con una inserción en la generación T₃ correspondientes a líneas transformantes independientes. Mediante el uso del confocal la proteína fluorescente SPL16-YFP no pudo detectarse, así que decidimos comprobar el nivel de expresión de los genes, y observamos niveles elevados de expresión del transcrito de *YFP* (**Fig. C1.2**). Cabe la posibilidad de que las proteínas SPL sean inestables y se vean degradadas rápidamente. De hecho, un estudio en arroz centrado en el gen *OsSPL14*, propone que la proteína correspondiente está regulada por la deubiquitinasa OTU1, que sería la encargada de regular los niveles de

proteína dirigiendo su degradación (Wang et al., 2017). Una regulación similar podría estar dándose también en *Arabidopsis*, ya sea mediante el homólogo a OTU1 o mediante otro mecanismo, y así se explicarían los bajos niveles de proteína que hacen indetectable a SPL16-YFP.

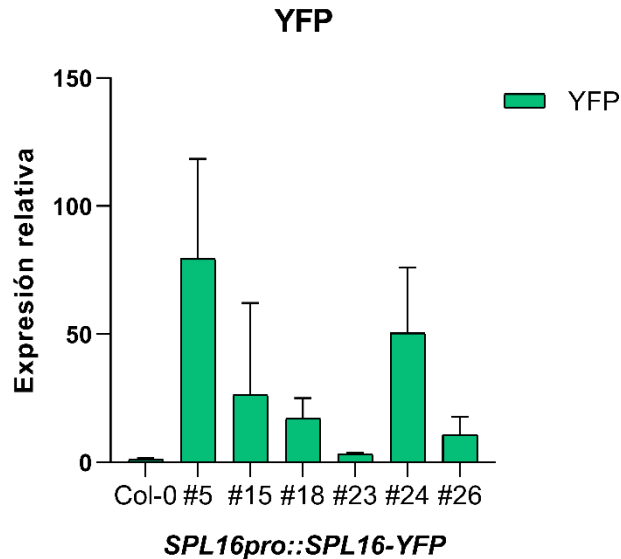


Figura C1.2. Expresión relativa de YFP en inflorescencia apical en líneas *SPL16pro::SPL16-YFP*. Los niveles relativos de expresión de YFP se determinaron en inflorescencias de tres semanas mediante RT-qPCR, utilizando *TIP41* como gen constitutivo de referencia. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas técnicas y las barras de error representan la desviación estándar y se han normalizado frente al valor obtenido en Col-0.

Los genes *SPL-ANQ* son necesarios para el correcto desarrollo de la planta y el control de la parada proliferativa.

Los resultados previos sugieren que los factores SPL-ANQ podrían ser reguladores de *FUL* y participar así en el control de la parada proliferativa. Para saber qué efecto tendría la pérdida de función de estos genes en este proceso, nos propusimos estudiar el fenotipo presentado por plantas cuyos genes *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16* estuvieran mutados.

Para ello se estudiaron cuatro mutantes distintos disponibles en el NASC: *sp1*, *sp12*, *sp14* y *sp16*. (SALK_200386C, SALK_017778, SAIL_1247_G10, GK_085F04.01, **Fig. C1.3**).

Se caracterizaron someramente los mutantes simples *sp1*, *sp12*, *sp14* y *sp16* y el doble mutante *sp12 sp14* y en ninguno de ellos se observó un fenotipo evidente distinto al silvestre en cuanto a porte y arquitectura general, y tampoco parecían estar afectados en la duración de la fase reproductiva.

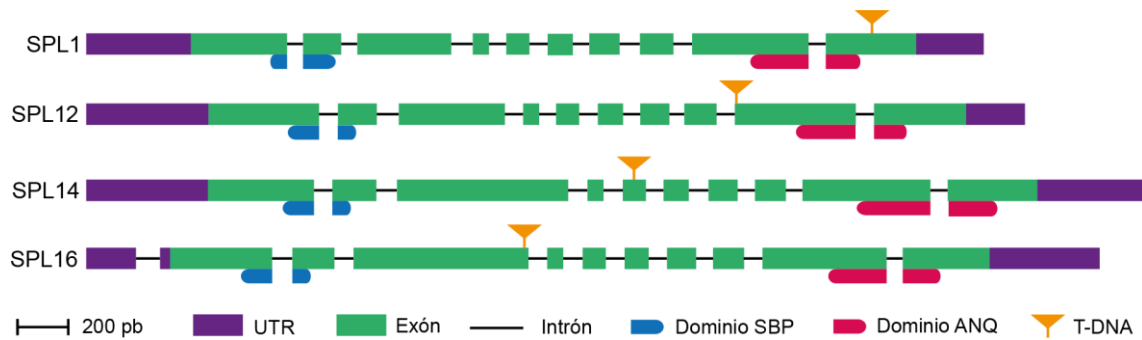


Figura C1.3. Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en los genes *SPL-ANQ* según la información disponible en el TAIR. La región codificante se representa en verde y las regiones 5'UTR y 3'UTR en morado. En azul se indica el dominio SBP, en rosa el dominio ANQ y en naranja la localización de cada inserción de T-DNA.

Por el contrario, combinaciones de orden superior sí presentaban alteraciones fenotípicas claras. El triple mutante *spl12 spl14 spl16* presentaba una diferencia significativa en el número total de flores producidas en la inflorescencia principal, produciendo Col-0 54 ± 6 flores y el triple mutante 58 ± 4 flores (**Fig. C1.4A**). También se apreciaba en *spl12 spl14 spl16* una disminución leve pero significativa en la fertilidad, ya que en el triple mutante se observaba cierto número de flores que no se fertilizaban y entraban en senescencia (7 ± 1), algo que en las plantas silvestres era muy poco frecuente ($0,45 \pm 0,5$; **Fig. C1.4B**). Sin embargo, la morfología observable en la mayoría de las flores, gineceos y frutos silvestres y mutantes no era diferente.

Los triples mutantes *spl1 spl12 spl14* y *spl1 spl14 spl16* presentaban defectos severos en el desarrollo. Las inflorescencias no crecían erguidas, las plantas mostraban poca dominancia apical y se observaban efectos pleiotrópicos en el desarrollo de los tallos, las flores y frutos, donde se producían malformaciones. Además, se observaba una disminución mayor en la fertilidad en la planta. Estos triples mutantes incluían el alelo mutante de *spl1*, por lo que es posible que *SPL1* sea el gen de más relevancia funcional en el clado.

El cuádruple mutante *spl1 spl12 spl14 spl16* (a partir de ahora *spl-quad*) presentaba un fenotipo severo y pleiotrópico. Las plantas *spl-quad* eran más altas (**Fig. C1.5B**) y con inflorescencias menos compactas (**Fig. C1.5D**) en comparación con la planta silvestre (**Fig.**

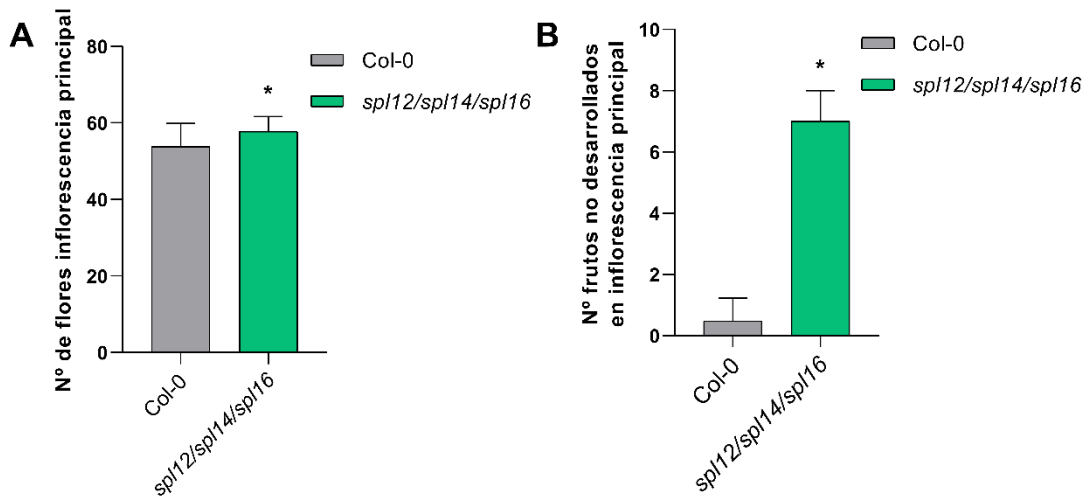


Figura C1.4. Conteo de flores en Col-0 y *sp12/14/16*. (A) Conteo de flores totales producidas en la inflorescencia principal de Col-0 y *sp12/14/16*. (B) Conteo de frutos que no se han desarrollado en la inflorescencia principal de Col-0 y *sp12/14/16*. Asterisco señala la diferencia significativa $p < 0.05$.

C1.5A,C). Aunque algunos frutos se desarrollaban con normalidad, la mayoría eran de menor tamaño (**Fig. C1.5F**) y presentaban alteraciones morfológicas, con una reducción del estilo y ensanchamiento de la parte apical de las valvas (**Fig. C1.5H**), mientras que otros en cambio no llegaban a desarrollarse del todo (**Fig. C1.5F**, silicua de más arriba y más abajo), de manera similar a lo que ocurría con el triple mutante *sp12 sp14 sp16*. Este hecho disminuía la producción de frutos completamente desarrollados en la planta, entendiendo frutos completamente desarrollados como aquellos que elongan completamente y producen >50 semillas (**Fig. C1.5F**, las tres silicuas centrales). También observamos en ocasiones que las plantas morían prematuramente, como si hubieran crecido en condiciones de sequía, lo que nos llevó a pensar que pudieran estar afectadas en las rutas de respuesta a estrés.

Para valorar el efecto de la mutación de estos genes en la parada proliferativa, se cuantificó el número de flores y de frutos producidos a lo largo de la inflorescencia principal. Estudios previos (Martínez-Fernández, 2017) determinaron que el número de frutos total producido por la inflorescencia principal de una planta es un indicador del tiempo de la parada proliferativa. Por otra parte, el número de frutos también depende del número de semillas producidas. Si la producción de semillas total es inferior a aproximadamente el 30% de las semillas que producen las plantas silvestres fértiles, se producen más frutos y se retrasa la parada proliferativa (Hensel, et al., 1994; Wuest et al., 2016). De esta manera,

plantas con esterilidad por encima de ese umbral producen casi el doble de flores y tienen un retraso considerable de la parada proliferativa.

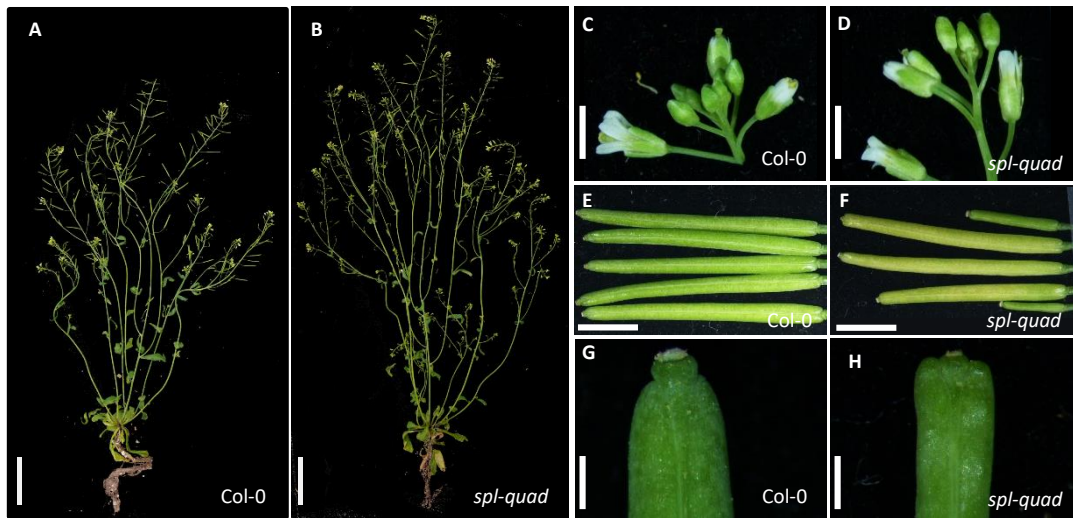


Figura C1.5. Fenotipo de las plantas *spl-quad*. Fotografía de planta completa Col-0 (A) y planta completa *spl-quad*, barra 5cm (B). Fotografía a bajo aumento de inflorescencia en Col-0 (C) y *spl-quad* (D), barra 2mm. Fotografía a bajo aumento de frutos en Col-0 (E) y *spl-quad* (F), barra 4mm. Fotografía a bajo aumento de la parte apical del fruto en Col-0 (G) y *spl-quad* (H), barra 2mm.

Al hacer el conteo del número de flores producidas en la inflorescencia principal en las plantas silvestres y en el mutante *spl-quad*, observamos que el número de flores en las plantas mutantes era leve pero significativamente superior al número de flores producidos por las plantas silvestres (57 ± 5 en el mutante, 54 ± 4 en silvestre), sugiriendo un retraso ligero en la parada proliferativa (Fig. C1.6A). Sin embargo, el número de frutos no viables (Fig. C1.5F, silicua de más abajo) era significativamente mayor en el cuádruple mutante que en la planta silvestre (Fig. C1.6B).

Como se mencionó anteriormente, una disminución en el número de semillas produce un aumento en el número de frutos y retraso en la parada proliferativa. Acorde con este hecho, el cuádruple produce un número mayor de flores que las plantas silvestres. Sin embargo, al tener una proporción de frutos viables reducida esperaríamos que este aumento en el número de flores fuera aún mayor.

Para eliminar el posible efecto de la diferencia en la producción de semillas en ambos genotipos, repetimos el experimento de forma que la baja fertilidad del cuádruple mutante no afectara a la comparación de ambos genotipos. Se realizó entonces nuevamente un conteo del número de flores producidas en la inflorescencia principal tanto en plantas silvestres como en mutantes, pero evitando la formación de semillas completamente al ir

eliminando continuamente todas las flores producidas en la inflorescencia principal, así como las coflorescencias y las ramas. De esta manera, ambos genotipos tienen condiciones de esterilidad completa y la comparación de la parada proliferativa se verá únicamente afectada por su genotipo.

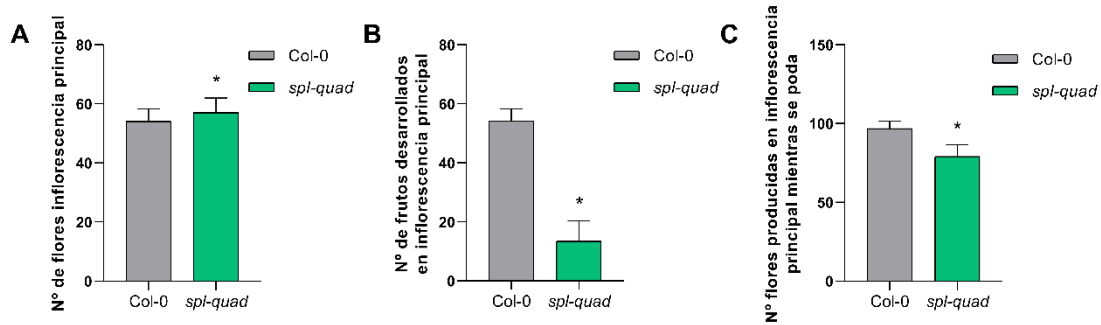


Figura C1.6. Conteo de flores en Col-0 y *spl-quad*. (A) Conteo de flores totales producidas en la inflorescencia principal de Col-0 y *spl-quad*. (B) Conteo de frutos totales producidos en la inflorescencia principal de Col-0 y *spl-quad*. (C) Conteo de flores totales producidas en la inflorescencia principal al ir podando mientras se producen en Col-0 y *spl-quad*. Asterisco señala la diferencia significativa $p < 0.05$.

Al contar las flores totales producidas en ausencia de desarrollo de frutos, observamos que el número total de flores aumentaba en ambos genotipos respecto a cuando no se poda (una media de 54 flores frente a 97 en el caso de silvestre, 57 frente a 79 en el mutante), como era de esperar (Fig. C1.6C). Sin embargo, aunque el cuádruple mutante producía más flores que cuando no se podaba, el número de flores totales producidas en ausencia de formación de semillas era menor que el de las plantas silvestres, lo cual indica que la parada proliferativa está adelantada, y por tanto que los factores SPL estudiados tendrían un papel en la represión de la parada del meristemo. Esta observación de algún modo concuerda con la escasa diferencia de frutos totales que había entre las plantas mutantes y las silvestres al hacer el experimento sin podar, a pesar de la baja fertilidad de los frutos *spl-quad*.

Nuestra hipótesis inicial era que los factores SPL podrían estar regulando positivamente al gen *FUL*. Esto implicaría que la pérdida de función de los genes *SPL* conllevaría una disminución en la expresión de *FUL* y por tanto se retrasaría la parada proliferativa. La caracterización de los mutantes *spl1 spl12 spl14 spl16*, sin embargo, sugiere que la parada proliferativa en el cuádruple mutante es temprana y no tardía, lo que podría significar que estos factores actúen en el control de la parada proliferativa de modo independiente a *FUL*, o bien que en realidad sean represores y no activadores de *FUL*.

Dado que *FUL* tiene un papel relevante en el control de la morfogénesis del gineceo y el fruto, y que la expresión de los genes *SPL* y de *FUL* solapa en este órgano, decidimos inspeccionar con detalle los frutos del cuádruple mutante *spl*. Aunque no presentan alteraciones muy notables, sí es posible apreciar cierta similitud entre estos frutos y los frutos de las líneas *35S::FUL* reportados previamente (Ferrándiz et al., 2000a). Las plantas de ambos genotipos presentan frutos en los que el estilo se ve reducido y las valvas se ensanchan apicalmente dando una forma rectangular al fruto (**Fig. 7B,C**). Estos fenotipos concuerdan con una posible actividad represora de estos factores SPL sobre *FUL*.

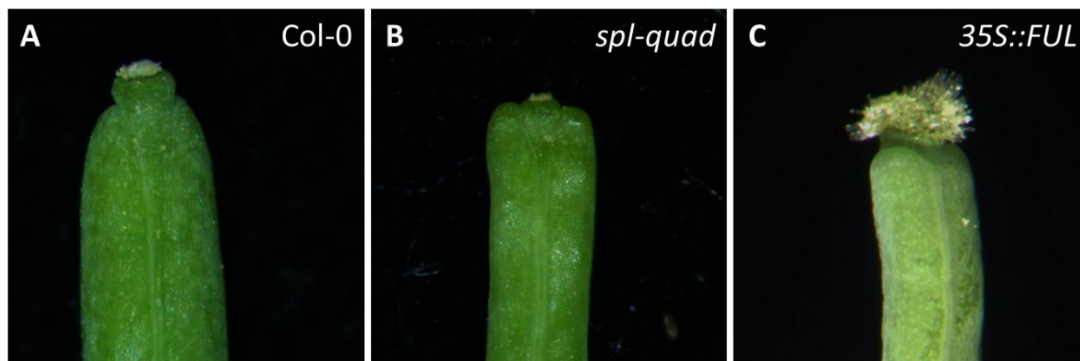


Figura C1.7. Comparación frutos *spl-quad* y *35S::FUL*. (A) Zona apical fruto Col-0 (B) Zona apical fruto *spl-quad*. (C) Zona apical fruto *35S::FUL*. Tanto *spl-quad* como *35S::FUL* muestran un ensanchamiento de las valvas y reducción de estilo.

Si los genes *SPL* reprimen la parada de los meristemas, bien a través de la regulación de *FUL* o bien de modo independiente a este, su sobreexpresión debería producir un retraso en la parada proliferativa. Para comprobar si esto ocurría, utilizamos líneas transgénicas sobreexpresoras, previamente generadas en el laboratorio.

Previamente en el laboratorio se había generado líneas transgénicas *35S::SPL14* (Ballester, 2016), sin observarse en ese momento ningún tipo de cambio en la morfología de las plantas, aunque las líneas sí producían la sobreexpresión del transcrito *SPL14* (Ballester, 2016). Este hecho, unido a que en las líneas reporteras generadas en esta tesis *SPL16pro::SPL16-YFP* no se detectaba fluorescencia, nos hizo plantearnos la hipótesis de que hubiera algún tipo de regulación posttraduccional del gen.

Como mencionamos anteriormente, un estudio previo relacionó a una enzima deubiquitinante que interacciona con algunos factores SPL en arroz, OsOTUB1, con la regulación por el proteosoma de estos factores (Wang et al., 2017). Existe la posibilidad, teniendo en cuenta que los factores SPL de nuestro estudio no están regulados por el miR156, de que la regulación por el proteosoma controle las cantidades de proteína, manteniéndola a bajos niveles, y que sea el motivo por el que no podamos detectar las

proteínas SPL16-YFP en el confocal o, en el caso de la tesis de Patricia Ballester (2016), efecto en la sobreexpresión de *SPL14*.

Para testar esta hipótesis, se identificó el homólogo de *OsOTUB1* en Arabidopsis, el gen AT1G28120 (*AtOTU1*). Una vez localizado, se obtuvieron dos alelos mutantes disponibles en NASC: *otu1-1* (SALK_058652) y *otu1-2* (SALK_149732) (Fig. C1.8A).

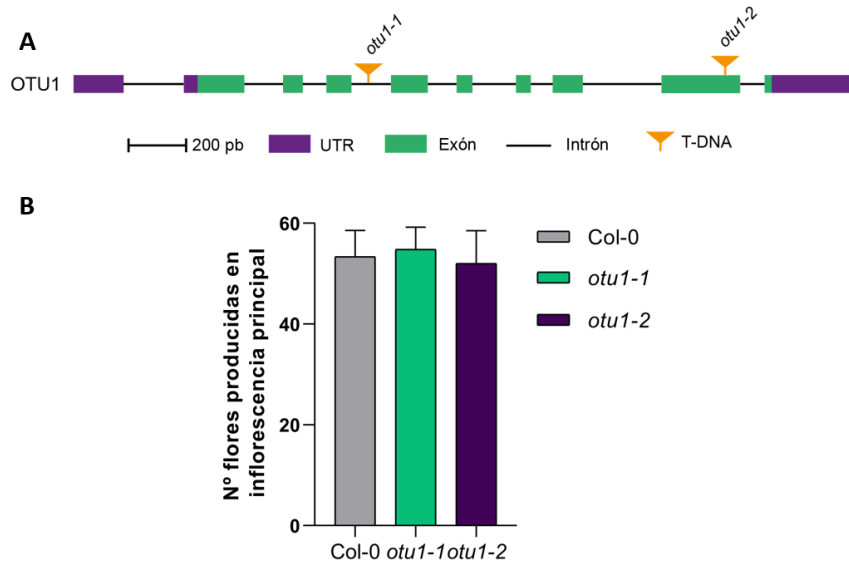


Figura C1.8. Diagrama del gen *OTU1* y conteo de flores producidas por sus mutantes. (A) Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en el gen *OTU1* según la información disponible en el TAIR. La región codificante se representa en verde y las regiones 5'UTR y 3'UTR en morado. En naranja la localización de cada inserción de T-DNA. **(B)** Conteo de flores producidas en la inflorescencia principal de Col-0 y los mutantes *otu1-1* y *otu1-2*.

Zang et al. (2020) ya utilizaron el mutante nulo *otu1-1* para comprobar que la actividad de esta deubiquitinasa es necesaria para la degradación proteica, así que podríamos esperar que de mantener su función también en Arabidopsis, se afectara la degradación de los factores SPL. Podría esperarse por esta razón que la mutación de *OTU1* provocara un aumento en la concentración de proteínas SPL en planta y por tanto un retraso en la parada proliferativa.

Al analizar morfológicamente los mutantes *otu1-1* y *otu1-2*, no se observó ninguna variación fenotípica evidente en comparación con el silvestre. Se realizaron conteos del número de frutos producidos hasta la parada proliferativa y en ningún caso hubo variación respecto a las plantas silvestres (Fig. C1.8B). Estos resultados sugieren que la ausencia de *OTU1* no afecta directamente a la parada proliferativa.

Tanto las plantas silvestres como los dos alelos mutantes de *OTU1* se transformaron con la construcción *35S::SPL14*. A continuación, se analizó fenotípicamente la T₁.

Al ser un análisis de T_1 , comparamos los porcentajes de frutos totales por inflorescencia principal producidos por cada línea en Col-0 frente *otu1-1* y *otu1-2* (Fig. C1.9). Las plantas sin transformar, tanto Col-0 como *otu1-1* y *otu1-2*, no mostraron plantas con más de 60 frutos. En cambio, al transformarse con *35S::SPL14*, en cada genotipo sí se obtuvo un porcentaje de plantas con más de 60 frutos, siendo el *otu1-1* el fondo genético que poseía mayor porcentaje de plantas con más de 60 frutos (Fig. C1.9C). Sin embargo, también se observó que en los fondos mutantes *otu1* aumentaba el porcentaje de plantas con menor cantidad de frutos (entre 30 y 49), siendo Col-0 el fondo genético donde el cambio en porcentajes estaba más sesgado hacia el retraso en la parada proliferativa (Fig. C1.9A).

Aunque estos resultados son preliminares, todo apunta a que OTU1 no regula a estos factores SPL o que quizá lo haga de forma redundante con otros genes, ya que no se aprecian efectos significativos de la mutación en el fenotipo de las plantas silvestres o las que sobreexpresan *SPL14*.

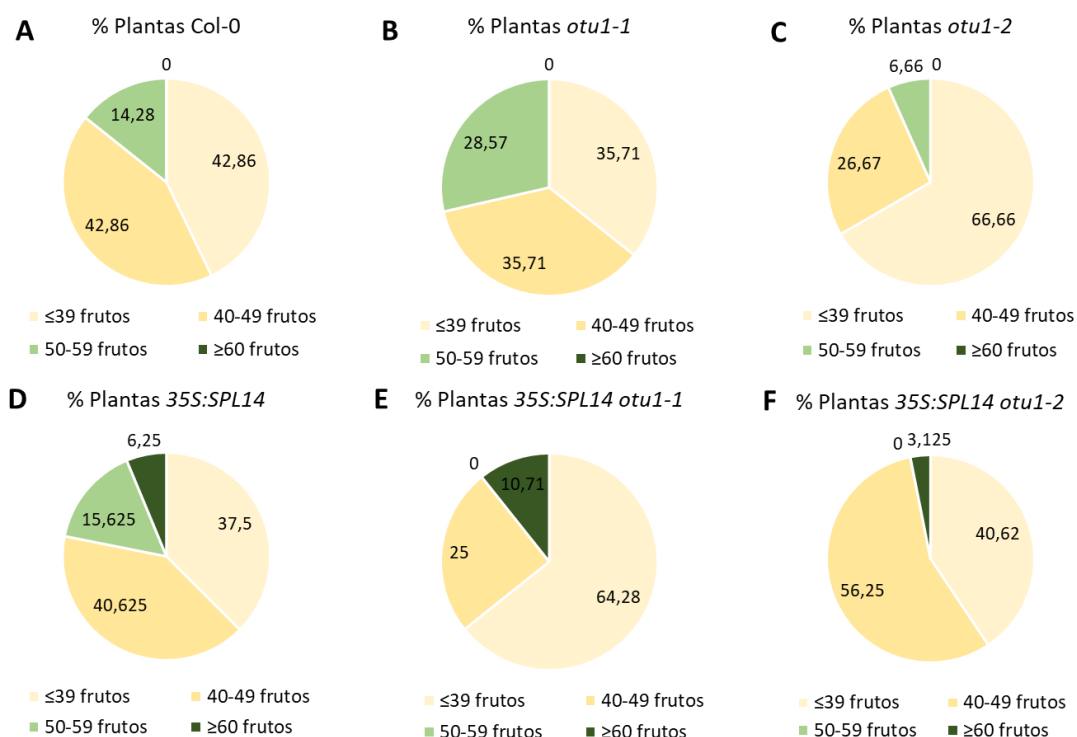


Figura C1.9. Diagrama de porcentaje de plantas según sus frutos producidos en Col-0, *otu1-1* y *otu1-2*. Diagrama de porcentajes de plantas con un rango de número de frutos producidos en plantas sin transformar de Col-0 (A), *otu1-1* (B) y *otu1-2* (C). Diagrama de porcentajes de plantas con un rango de número de frutos producidos en plantas T_1 *35S::SPL14* con fondo Col-0 (D), *otu1-1* (E) y *otu1-2* (F).

Relación de los genes *SPL-ANQ* con el gen *FUL*

Hasta ahora los datos sugieren que los genes *SPL-ANQ* pueden estar involucrados en el control de la parada proliferativa y que este control podría estar mediado por la inhibición de la expresión de *FUL*. Para estudiar si la relación entre *SPL1*, *SPL12*, *SPL14*, *SPL16* y *FUL* propuesta es cierta, se realizaron diversos experimentos.

En primer lugar, quisimos valorar si la actividad del promotor de *FUL* se veía afectada por la mutación de los genes *SPL-ANQ*. Si los genes *SPL-ANQ* regulan negativamente a *FUL*, la mutación de estos genes debería provocar un aumento en la actividad del promotor *FUL*. Con este objetivo, utilizamos nuevamente el gen marcador *GUS* bajo el promotor de *FUL*. Se realizó un cruzamiento entre *spl-quad* y la línea *FULpro::GUS*, de esta manera podíamos comparar la actividad del promotor *FUL* en fondo Col-0 y mutante.

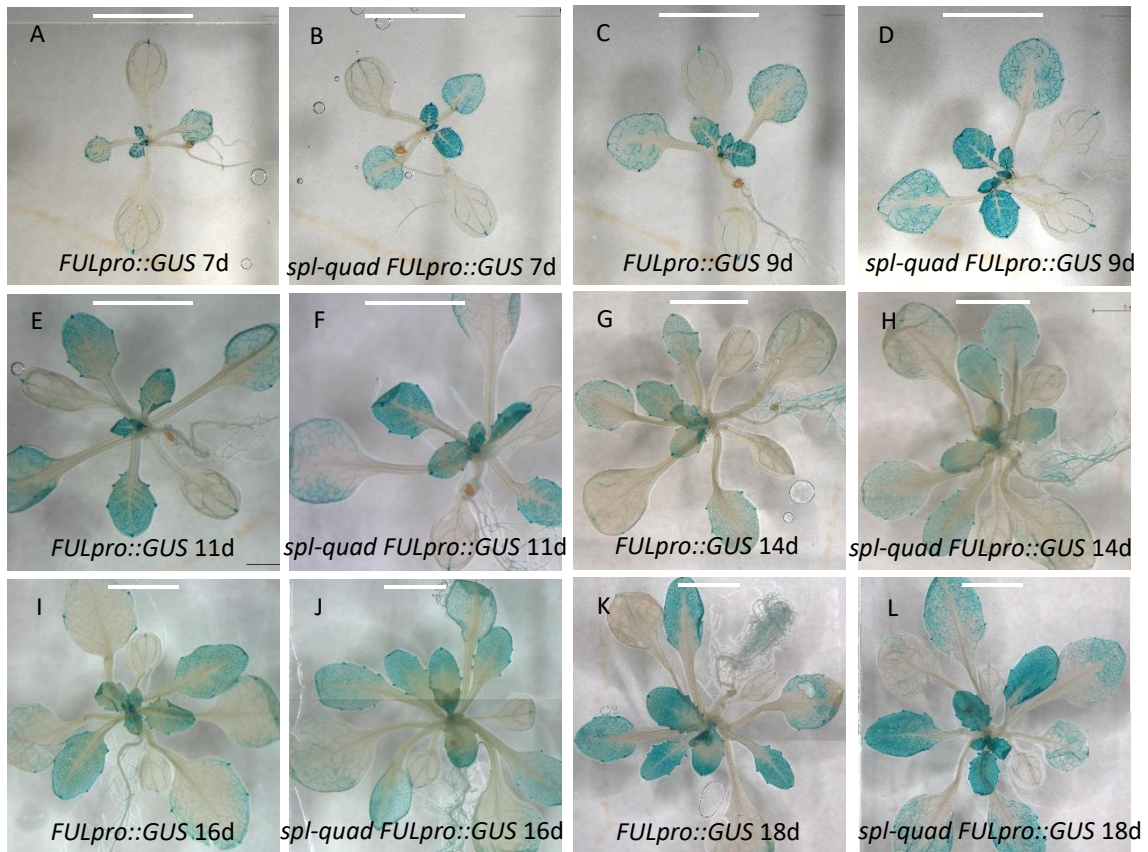


Figura C1.10. Patrón de expresión en distintos momentos del desarrollo vegetativo de plantas con el reportero *FULpro::GUS* en fondo Col-0 y *spl-quad*. Detección histoquímica de la actividad *GUS* dirigida por el promotor *FUL*. Fotografía a bajo aumento de rosetas de *FULpro::GUS* en fondo Col-0 7 días (A), 9 días (C), 11 días (E), 14 días (G), 16 días (I) y 18 días (K) tras la germinación. Fotografía a bajo aumento de rosetas de *FULpro::GUS* en fondo *splquad* 7 días (B), 9 días (D), 11 días (F), 14 días (H), 16 días (J) y 18 días (L) tras la germinación. Barra de 5mm.

El estudio de la actividad del gen marcador GUS bajo el promotor *FUL* en ambos fondos se realizó durante la fase vegetativa de la planta. Se estudió en planta completa cada dos-tres días desde 7 días después de germinar hasta 18 días después de germinar.

En plantas en estadios vegetativos, la expresión del promotor *FUL* parecía ser mayor en el fondo *spl-quad* que en Col-0, sobre todo en las hojas más jóvenes en cada tiempo (**Fig. C1.10**). Sin embargo, es difícil determinar con seguridad que no sea una apreciación subjetiva inexacta, ya que a pesar de seguir el mismo protocolo y tener el mismo tiempo de germinación, las plantas *spl-quad* parecían desarrollarse ligeramente más rápido que las Col-0, produciendo en el mismo tiempo más hojas y de mayor tamaño que las plantas silvestres.

Debido a la dificultad para discernir entre la intensidad de señal GUS entre los meristemas del mutante y Col-0, se procedió a tomar muestras de los meristemas apicales de las plantas desde el alzado del tallo tras la transición floral hasta la parada proliferativa, una vez a la semana, para analizar la acumulación de *FUL* por qRT-PCR. De esta manera se podría observar diferencia en expresión de *FUL* a lo largo del tiempo de floración en el meristemo apical del tallo. Desde el alzado de la floración hasta las tres semanas después del alzado, *FUL* aumentaba de modo continuo en el meristemo de Col-0, y no había diferencias significativas en la expresión de *FUL* en *spl-quad* respecto a Col-0 en el alzado ni en la segunda semana desde el alzado (**Fig. C1.11**). Una y tres semanas después del alzado, sí que hay un pequeño incremento y disminución, respectivamente, significativos de *FUL* en *spl-quad* respecto a Col-0 (**Fig. C1.11**). Sin embargo, durante la parada proliferativa en el mutante *spl-quad* casi se duplicaba la expresión de *FUL* respecto a Col-0 (**Fig. C1.11**). Este hecho concuerda con la hipótesis de la represión de *FUL* por estos factores SPL, aunque ésta solo se evidencie en las etapas finales del desarrollo de la inflorescencia. Los genes *SPL-ANQ* aumentan su expresión directamente durante la parada proliferativa, volviendo a los niveles bajos tras reactivar el meristemo mediante poda (González-Cuadra, comunicación personal), por lo que podría ser que el efecto en *FUL* sea más fuerte en el ápice inflorescente parado por ser la mutación de los genes más evidente en ese estadio.

Para validar genéticamente el efecto de la mutación de los genes *SPL-ANQ* sobre el gen *FUL*, se necesitaba la obtención de un quintuple mutante *spl-quad ful*. Como conseguir un quintuple mutante mediante cruzamiento es un proceso lento y costoso, se procedió a mutar mediante CRISPR el gen *FUL* en el fondo *spl-quad*. Para ello se utilizó el método descrito por Wang et al. (2015) para la realización del CRISPR, que permitía tener una

planta transgénica homocigota o mutantes bialélicos en la T₁ con alta frecuencia. Se seleccionaron dos sgRNA que cortaran de la manera más específica posible en el gen *FUL*, para obtener una delección de 744 pares de bases que incluía la mayor parte

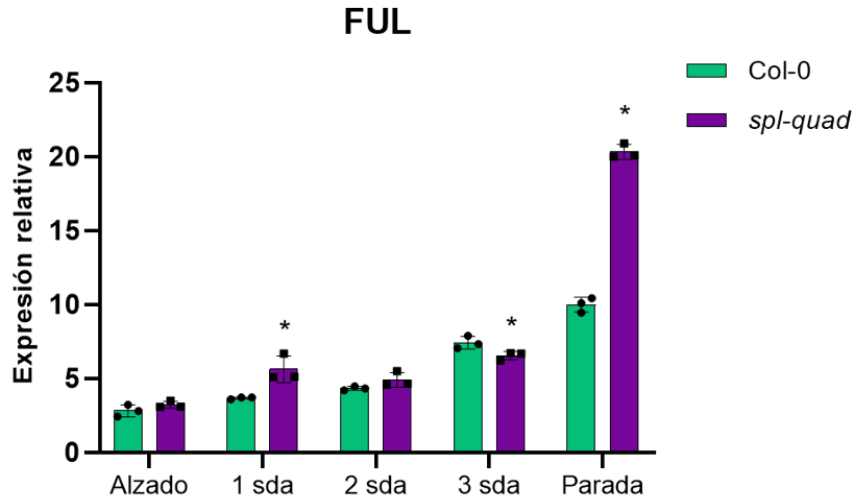


Figura C1.11. Análisis por qRT-PCR de los niveles de transcrito de *FUL* en el meristemo apical del tallo a lo largo del desarrollo de Col-0 y *spl-quad*. La expresión de *FUL* aumenta progresivamente en Col-0, mientras que en *spl-quad* cambia con el tiempo siendo mayor la primera semana después del alzado y menor a las tres semanas después del alzado que Col-0. Durante la parada proliferativa se puede observar la diferencia más significativa, siendo la expresión de *FUL* aproximadamente el doble en *spl-quad* que en Col-0. Asterisco señala la diferencia significativa $p < 0.05$.

del primer exón y del primer intrón. (Fig. C1.12). Las plantas se genotiparon amplificando una región genómica de *FUL* de 1522pb y buscando aquellas plantas en las que la banda amplificada tuviera un tamaño reducido en 744pb (es decir, una banda de 778pb) frente a la silvestre (que tenía 1522pb). De 188 plantas genotipadas, sólo una mostraba la delección esperada en homocigosis, que se comprobó mediante secuenciación. Esta planta fue posteriormente utilizada para su caracterización. La secuencia de aminoácidos obtenida tras la eliminación de la región inicial del gen por CRISPR se puede ver en el Anexo I.

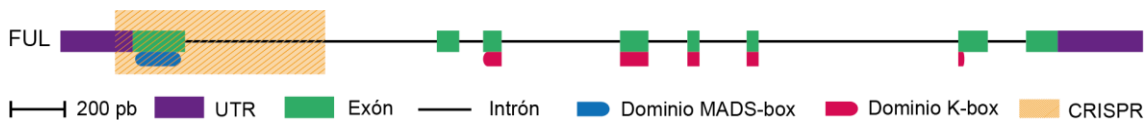


Figura C1.12. Diagrama de la localización del CRISPR del gen *FUL*. La región codificante se representa en verde y las regiones 5'UTR y 3'UTR en morado. En azul se indica el dominio MADS-box, en rosa el dominio K-box y la caja naranja representa la región eliminada mediante el CRISPR, que incluye todo el dominio MADS-box.

Los genes SPL regulados por miR156 y su relación funcional con *FUL* en la etapa vegetativa y tiempo de floración han sido ya estudiados previamente (Wang et al., 2015a),

donde los factores SPL actúan como activadores de *FUL* y regulan el tiempo de floración de las plantas. En estos estudios, al disminuir la expresión de los genes *SPL*, se disminuye la expresión de *FUL* y a su vez se produce un retraso en el tiempo de floración. En este caso, nuestra hipótesis es que los genes *SPL-ANQ* son represores de *FUL*, por lo que al disminuir los niveles de *SPL* aumentaría *FUL* y se adelantaría la floración.

Por este motivo, la caracterización del quintuple mutante *spl-quad ful-cr* comenzó mediante el estudio de su tiempo de floración. Ya habíamos visto en los análisis de actividad GUS durante la fase vegetativa que parecía que las plantas *spl-quad* tenían un ritmo de crecimiento más rápido que el Col-0. Para este experimento se crecieron las plantas en condiciones de día largo, que son las condiciones habituales de crecimiento de *Arabidopsis*, y día corto ya que este tipo de condiciones de luz a menudo acentúa las diferencias en el tiempo de floración entre distintos genotipos. Para ello se cuantificó el número de hojas producidas hasta la primera flor en antesis diferenciando entre hojas de roseta y hojas caulinares en todas las líneas, anotando el número de días que tardaba en suceder tanto el alzado del tallo como la primera flor en antesis tras la germinación.

En día largo, al contar el número de hojas de roseta no pudimos observar una diferencia significativa entre Col-0 y *spl-quad* (12 hojas producidas por ambas líneas; **Fig. C1.13A**). El número de días hasta el alzado en cambio era menor, 21 días en Col-0 y 20 días en el *spl-quad*, aunque nuevamente no se trataba de una diferencia significativa (**Fig. C1.13B**). En el caso de *ful-2* y el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*, ambos genotipos producen el mismo número de hojas (~11 hojas, **Fig. C1.13A**) y días (24 días, **Fig. C1.13B**) hasta el alzado. En el número de hojas de roseta, solo hubo diferencia significativa entre Col-0 y *ful-2* (**Fig. C1.13A**). En cuanto al número de días hasta el alzado hubo diferencia significativa entre Col-0 y *quad-spl* y *ful-2* y *spl-quad ful-cr*, donde *ful-2* y *spl-quad ful-cr* necesitaban ~4 días más para el alzado que en Col-0 y *quad-spl* (**Fig. C1.13A-B**).

En cuanto al número de hojas totales (caulinares más de roseta; **Fig. C1.13A**), Col-0 y *spl-quad* comparten el número de hojas que se producen hasta la primera flor en antesis (~15 hojas). Al igual que ocurre en el tiempo hasta el alzado, hay un día de diferencia no significativa hasta la primera flor en antesis entre Col-0 y *spl-quad* (27 y 26 días, respectivamente; **Fig. C1.13B**), pero esta diferencia se debe al tiempo hasta el alzado, siendo el número de días hasta la primera flor desde el alzado ~6 días en ambos casos. En el caso de *ful-2* y el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*, el número de días hasta la primera flor en antesis es el mismo (~30 días en ambos casos; **Fig. C1.13B**), y el número de hojas producidas hasta la primera flor en antesis también (~15 hojas). A diferencia del caso del

alzado, hay una diferencia significativa tanto en hojas caulinares producidas como en días hasta la primera flor en antesis entre Col-0 y *spl-quad* y *ful-2* y *spl-quad ful-cr*. En el caso de las hojas, sí que hay una diferencia, pero no es en las hojas totales sino que es en la producción de hojas caulinares, siendo ~3 el número de hojas caulinares producidas por Col-0 y *spl-quad*, mientras que *ful-2* y *spl-quad ful-cr* producen ~4 hojas caulinares. En cuanto a los días hasta la primera flor en antesis, la diferencia en el total de días es significativa (~26 días en Col-0 y *spl-quad* frente a ~30 de *ful-2* y *spl-quad ful-cr*), pero esta diferencia se debe nuevamente a la diferencia en el tiempo de alzado, ya que los días desde el alzado hasta la primera flor son similares (~6 días en todos los casos).

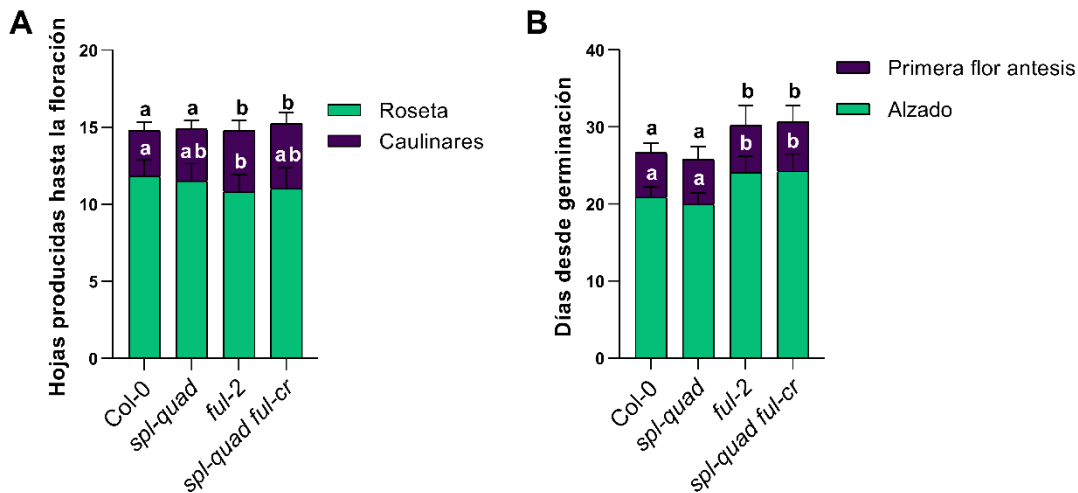


Figura C1.13. Conteo de hojas de roseta y caulinares producidas y días tras la germinación necesarios en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr* hasta el alzado y primera flor en antesis en día largo. (A) Conteo de hojas totales producidas (de roseta y caulinares) en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr* hasta la primera flor en antesis (B) Conteo de los días desde la germinación hasta el alzado y hasta primera flor en antesis en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr*. La letra a implica no diferencia significativa frente a Col-0, b no diferencia significativa frente a *ful-2*, $p < 0,05$.

En día corto, al contar el número de hojas de roseta, pudimos observar una ligera diferencia no significativa entre Col-0 y *spl-quad* (69 hojas y 71 hojas, respectivamente; **Fig. C1.14A**). No obstante, el número de días hasta el alzado era menor, 87 días en Col-0 y 85 días en el *spl-quad*, aunque tampoco era una diferencia significativa (**Fig. C1.14B**). Esta diferencia sin embargo se acrecienta en el caso de *ful-2* y el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*, donde ambos genotipos tienen un cambio estadísticamente significativo no sólo con Col-0 y *spl-quad*, sino que también entre ellos, tanto en número de hojas de roseta (80 *ful-2*, 87 *spl-quad ful-cr*; **Fig. C1.14A**) como en días hasta el alzado (118 *ful-2*, 106 *spl-quad ful-cr*; **Fig. C1.14B**). Es decir, el quintuple mutante produce ~7 hojas de roseta más hasta el alzado que *ful-2* en ~12 días menos (**Fig. C1.14A-B**).

En cuanto al número de hojas totales (caulinares más de roseta; **Fig. C1.14A**), Col-0 y *spl-quad* comparten el número de hojas que se producen hasta la primera flor en antesis (78 y 77 hojas, respectivamente). El mutante *spl-quad* tarda más días en dar una flor en antesis (100 días) que Col-0 (96 días), pero la diferencia no es estadísticamente significativa (**Fig. C1.14B**). En el caso de *ful-2* y el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*, el número de días hasta la primera flor en antesis es el mismo (130 días en ambos casos; **Fig. C1.14B**), sin embargo, el quintuple mutante produce ~10 hojas más que *ful-2* (97 hojas *ful-2*, 107 hojas *spl-quad ful-cr*), siendo este cambio estadísticamente significativo (**Fig. C1.14A**).

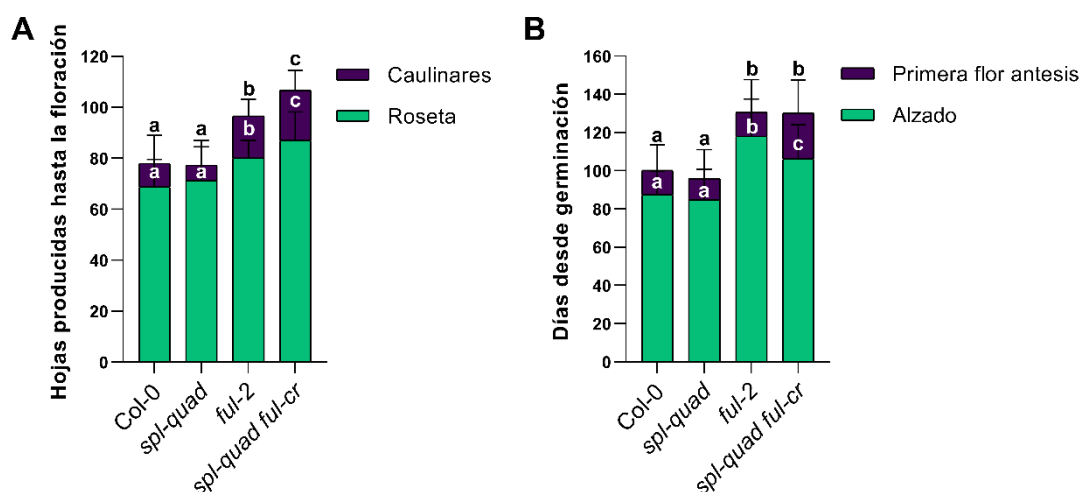


Figura C1.14. Conteo de hojas de roseta y caulinares producidas y días tras la germinación necesarios en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr* hasta el alzado y primera flor en antesis en día corto. **(A)** Conteo de hojas totales producidas (de roseta y caulinares) en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr* hasta la primera flor en antesis **(B)** Conteo de los días desde la germinación hasta el alzado y hasta primera flor en antesis en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr*. La letra a implica no diferencia significativa frente a Col-0, b no diferencia significativa frente a *ful-2* y c diferencia significativa frente a todos los otros genotipos $p < 0,05$.

Estos datos indican que en las plantas mutantes para los genes *SPL* se ve afectado el plastocrono, aumentando su ritmo de desarrollo. Esta observación es interesante, ya que ya se ha publicado que los genes *SPL9* y *SPL15*, que son diana de miR156, están relacionados con la regulación del plastocrono y, por tanto, podría ser una actividad compartida con el resto de la familia génica (Wang et al., 2008).

Al mutar el gen *FUL* las plantas retrasan su tiempo floración de igual manera si están los genes *SPL* mutados o no, ya que el tiempo hasta la primera flor en antesis es el mismo en el simple mutante *ful-2* y en el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*. Sin embargo, la aceleración del plastocrono se observa únicamente cuando los genes *SPL* están mutados, siendo más fuerte cuando se incluye la mutación *ful-cr*, lo que implica una mayor

producción de hojas hasta la primera flor en antesis (hojas de roseta más hojas caulinares) en menor tiempo. En cualquier caso, las diferencias en los tiempos de floración de los diferentes genotipos estudiados no son muy importantes, por lo que podemos especular con que los genes *SPL-ANQ* no parecen ser reguladores cruciales de la transición floral.

Una vez analizado el tiempo floración de los diferentes genotipos, estudiamos sus cambios fenotípicos a lo largo del desarrollo floral (**Figura C1.15**).

En cuanto al desarrollo general de la planta, el quintuple mutante *spl-quad ful-cr* a partir del alzado mostró efectos pleiotrópicos más severos que el cuádruple *spl-quad*, mostrando una mayor hipersensibilidad a estrés. Bajo condiciones óptimas puede crecer hasta la parada proliferativa, no obstante, cuando las condiciones ambientales son sub-óptimas, las plantas disminuían su tamaño.

En la **Figura C1.15A-D** podemos observar las plantas completas de genotipo silvestre (**Fig. C1.15A**), *spl-quad* (**Fig. C1.15B**), *ful-2* (**Fig. C1.15C**) y *spl-quad ful-cr* (**Fig. C1.15D**) crecidas en condiciones óptimas y tras producir unas 35 flores. En *spl-quad ful-cr* los tallos crecen menos erguidos y pierden parte de su firmeza (**Fig. C1.15D**), similar a lo que ocurre en *spl-quad* (**Fig. C1.15B**).

Las flores que se producían en los fondos mutantes presentaban diferencias con las silvestres o las de los mutantes *ful-2* (**Fig. C1.15E-H**). A diferencia de Col-0 (**Fig. C1.15E**) y *ful-2* (**Fig. C1.15G**) que tenían flores abiertas donde los pétalos eran visibles y se expandían con normalidad, en el cuádruple mutante *spl-quad* (**Fig. C1.15F**) las flores permanecían cerradas en estadios avanzados de desarrollo, cuando ya debía haberse producido la antesis, y solo en algunas se podían observar los pétalos, un fenotipo que se veía acentuado en el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*, en el que las flores no se abrían y no mostraban los pétalos en ningún caso (**Fig. C1.15H**). De igual manera se veía afectado el desarrollo del gineceo de estas plantas, donde todos eran diferentes a Col-0 (**Fig. C1.15M**). En el caso de *ful-2*, como ya ha sido descrito previamente, se observaba una disminución en el tamaño del ovario, y una elongación mayor del estilo (**Fig. C1.15O**). En el cuádruple mutante *spl-quad*, el gineceo era similar al de Col-0 pero la falta de apertura de la flor dificultaba su crecimiento, provocando su deformación (**Fig. C1.15N**). El quintuple mutante *spl-quad ful-cr* presentaba gineceos de tamaño similar a *ful-2* y que también se deformaba apicalmente al elongarse, probablemente también debido a la falta de apertura de la flor (**Fig. C1.15P**).

Cuando observamos los frutos 4-8 de la inflorescencia principal en todos los genotipos mencionados observamos cómo al inicio de la floración los frutos del cuádruple

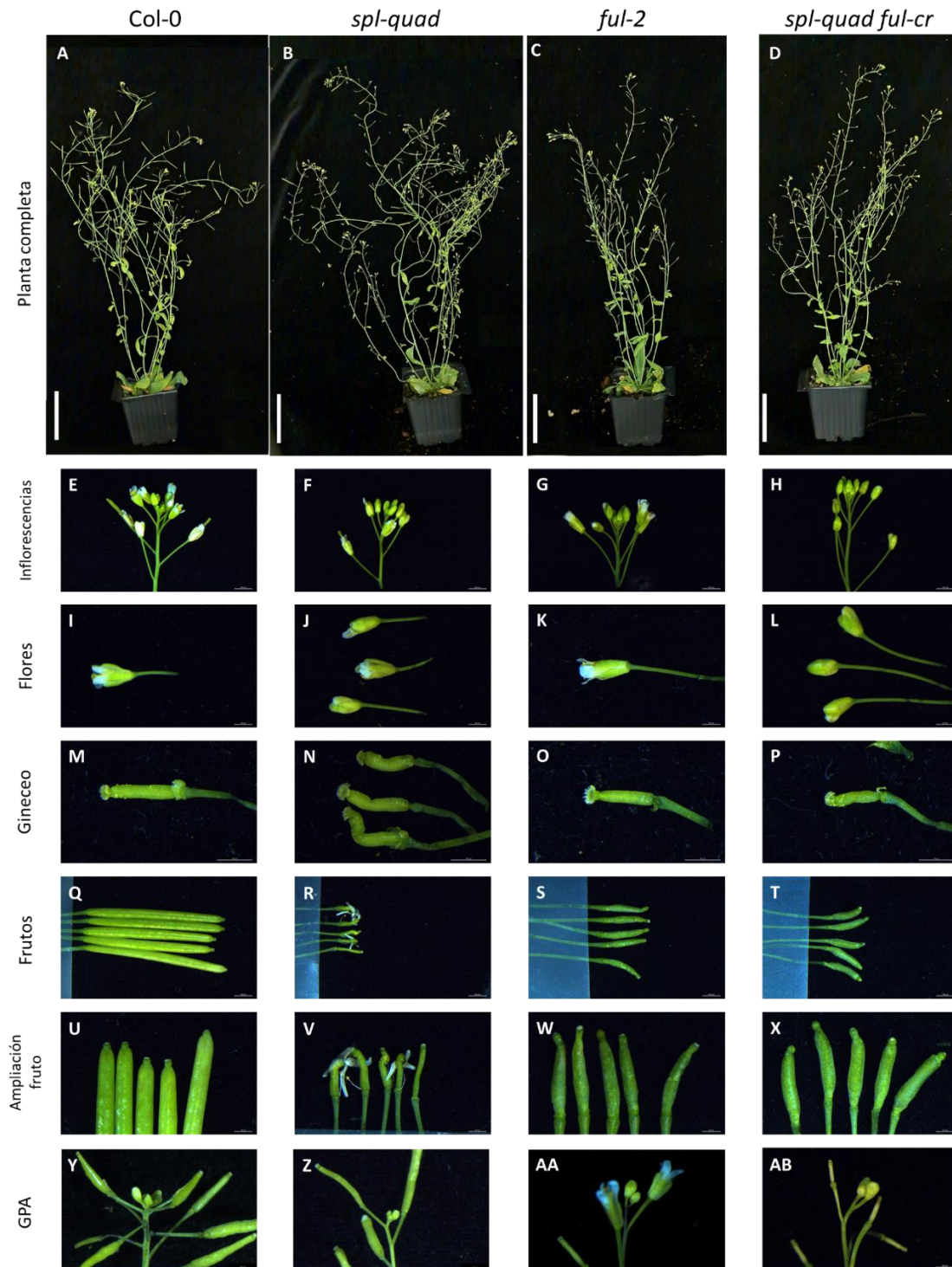


Figura C1.15. Fenotipo de las plantas *spl-quad ful-cr*. Fotografía de planta entera en Col-0 (A) y *spl-quad* (B), *ful-2* (C) y *spl-quad ful-cr* (D) barra 5cm. Fotografía a bajo aumento de la inflorescencia en Col-0 (E) y *spl-quad* (F), *ful-2* (G) y *spl-quad ful-cr* (H) barra 1cm. Fotografía a bajo aumento de la flor en Col-0 (I) y *spl-quad* (J), *ful-2* (K) y *spl-quad ful-cr* (L) barra 0,5cm. Fotografía a bajo aumento del gineceo en Col-0 (M) y *spl-quad* (N), *ful-2* (O) y *spl-quad ful-cr* (P) barra 0,5cm. Fotografía a bajo aumento de frutos de Col-0 (Q) y *spl-quad* (R), *ful-2* (S) y *spl-quad ful-cr* (T) barra 1cm. Fotografía a mayor aumento de frutos de Col-0 (U) y *spl-quad* (V), *ful-2* (W) y *spl-quad ful-cr* (X) barra 0,5cm. Fotografía a bajo aumento del ápice inflorescente parado de Col-0 (Y) y *spl-quad* (Z), *ful-2* (AA) y *spl-quad ful-cr* (AB) barra 1cm.

mutante prácticamente no se desarrollaban (**Fig. C1.15R,V**), contrastando con los frutos bien formados de Col-0 (**Fig. C1.15Q,U**). Este fenotipo parecía atenuarse en las etapas más tardías de la fase reproductiva, y así, los frutos más apicales se fertilizaban y desarrollaban mejor (**Fig. C1.5F**). Esto puede deberse a que las flores iniciales no se llegan a abrir y el estigma queda cubierto por sépalos y pétalos dificultando la polinización, como se puede observar al ver que los pétalos siguen unidos a estos frutos sin desarrollar (**Fig. C1.15R,V**). Los frutos *ful-2*, como ya ha sido descrito, son de menor tamaño que los Col-0, con valvas reducidas y replum ensanchado, y un estilo elongado (**Fig. C1.15S,W**), y pudimos observar que los del quintuple mutante *spl-quad, ful-cr* presentaban una morfología similar (**Fig. C1.15T,X**) donde, a pesar de que las flores no se abrían, sí que se producían frutos similares a los *ful-2*, aunque con un tamaño ligeramente menor. La producción de frutos no fertilizados de los mutantes *spl-quad* se reducía tras combinarlos con la mutación del gen *FUL*, algo que podría deberse a que los gineceos en este fondo genético eran de un tamaño mucho más reducido que los de Col-0 y *spl-quad* y quizá no quedaran tan encapsulados por los sépalos y pétalos de la flor no abierta, permitiendo la polinización.

Por último, la diferencia más relevante entre estos genotipos fue que mientras que los mutantes *ful-2* no experimentan la parada proliferativa (**Fig. C1.15AA**) y por tanto producen frutos hasta que la planta muere por condiciones externas, el quintuple mutante *spl-quad ful-cr* (**Fig. C1.15AB**) producía una parada proliferativa morfológicamente similar al de Col-0 (**Fig. C1.15Y**) y *spl-quad* (**Fig. C1.15Z**), con el característico grupo de yemas florales no desarrolladas al final de la fase reproductiva. Así, podemos decir que la mutación de los genes *SPL-ANQ* anulaba el bloqueo indefinido de la parada proliferativa que provoca la mutación de *FUL*.

Para profundizar en la caracterización de estos fenotipos con respecto a la parada proliferativa, procedimos a cuantificar las flores producidas por la inflorescencia principal de cada uno de estos genotipos en el tiempo (**Fig. C1.16**). En cuanto al número de flores producidas por la inflorescencia principal, ya sabíamos que entre Col-0 y *spl-quad* se generaban diferencias en el número de flores (**Fig. C1.6**), también se sabía por estudios anteriores que *ful-2* no deja de producir flores (Balanzà et al., 2018; Merelo et al., 2022). En el caso del quintuple mutante *spl-quad ful-cr* observamos que producía un número de flores similar a *spl-quad*, suprimiendo el fenotipo de *ful-2* (**Fig. C1.16**). En la **Figura C1.16** podemos observar también que Col-0 fue la primera línea en dejar de producir flores, seguido de *spl-quad* y *spl-quad ful-cr*. En el caso de *ful-2* se dejaron de contar las flores producidas dos semanas después de la parada proliferativa de Col-0 (**Fig. C1.16**).

Puesto que habíamos determinado que los genes *SPL-ANQ* podrían actuar como represores de *FUL*, su pérdida de función debía producir un aumento de los niveles de *FUL* y esto podría explicar un adelanto en la parada proliferativa. Así, podríamos esperar al mutar el gen *FUL* en el fondo *spl-quad* un fenotipo similar al del mutante *ful-2* en cuanto a la terminación de la fase reproductiva. Sin embargo, en el mutante *spl-quad ful-cr* el fenotipo característico de *ful* de ausencia de la parada proliferativa se vio revertido a la producción de un número limitado de flores terminando en la parada proliferativa. El hecho de que la mutación *ful* no sea epistática sobre *spl-quad* en cuanto a la terminación de la fase reproductiva nos sugiere que la relación funcional de estos genes *SPL-ANQ* y *FUL* podría ser más compleja de lo anticipado y que, por otro lado, los genes *SPL-ANQ* podrían afectar a la parada proliferativa también de un modo independiente de *FUL*. En este punto, nos propusimos explorar cuáles podrían ser las otras vías por las que los factores *SPL* estudiados podrían estar afectando a la parada proliferativa.

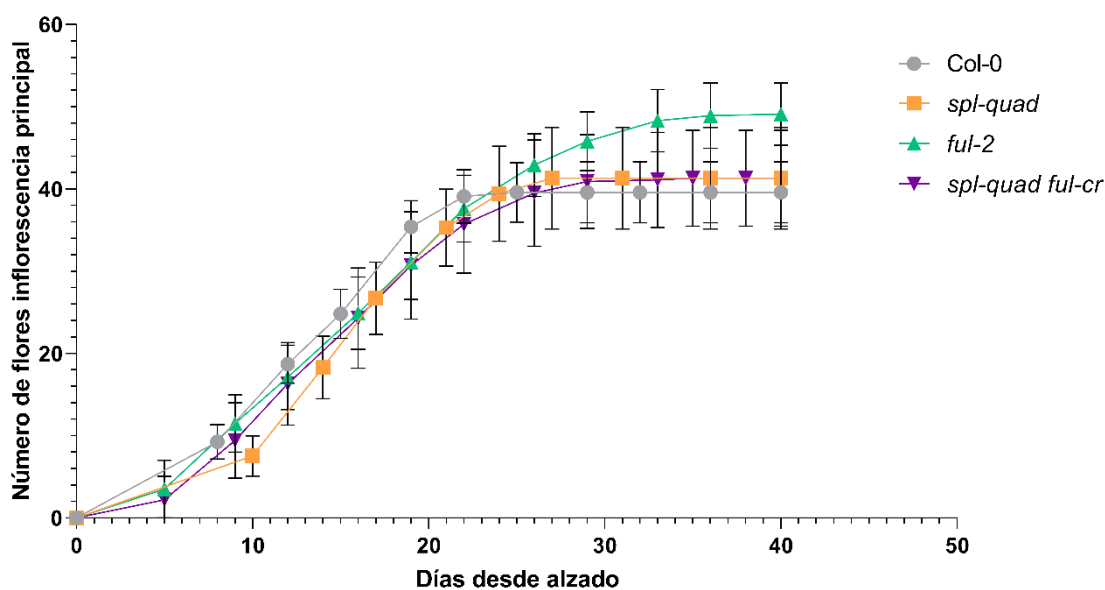


Figura C1.16. Conteo de flores producidas en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr* desde el alzado hasta la parada proliferativa. Tras el alzado se contaron las flores producidas por la inflorescencia principal una o dos veces por semana en Col-0, *spl-quad*, *ful-2* y *spl-quad ful-cr*. El quintuple mutante *spl-quad ful-cr* revierte el efecto de la mutación de *FUL* en el número de flores producidas. Las flores producidas por *ful-2* dejaron de contarse dos semanas después de la parada proliferativa de Col-0.

Los genes *SPL-ANQ* podrían estar regulando la parada de la proliferación afectando a la señalización por ABA

Como hemos descrito, la pérdida de función de los genes *SPL-ANQ* estudiados provocaba fenotipos pleiotrópicos que afectaban procesos diversos de desarrollo. Además,

la línea cuádruple mutante parecía hipersensible a factores ambientales, sugiriendo de algún modo que estos genes podrían ser importantes en las rutas relacionadas con la respuesta a estrés. Nuestros datos sugerían que los genes *SPL-ANQ* podrían ser reguladores negativos de *FUL*, por lo que en el mutante *spl-quad* la acumulación de *FUL* podría promover la parada de la actividad proliferativa del meristemo. Sorprendentemente, observamos que respecto a la parada proliferativa del meristemo inflorescente, el mutante *spl-quad ful-cr* era epistático sobre *ful*. La parada de la actividad del meristemo inflorescente descrita en el mutante *spl-quad ful-cr* jamás se observó en el mutante *ful-2*, sugiriendo que los genes *SPL-ANQ* pudieran también regular la parada de la proliferación de forma independiente de *FUL* o que al menos *FUL* no actuara exclusivamente aguas debajo de *SPL-ANQ*.

La identificación de los genes que se ven afectados en la ausencia de la actividad *SPL-ANQ* podría aportarnos más información sobre la función que tienen estos genes en el meristemo y en la planta en general. Con este fin, nos propusimos analizar el perfil transcriptómico del cuádruple mutante *spl-quad* en ápices inflorescentes, tanto al inicio de la floración como en un tiempo cercano a la parada proliferativa y compararlo respecto al de las plantas silvestres.

Se colectaron al menos 15 ápices por cada una de las tres réplicas biológicas analizadas por cada condición a los que se les había eliminado el mayor número posible de yemas florales. Se cogieron muestras de Col-0 y del cuádruple mutante *spl-quad* 10 días y tres semanas después del alzado. Se escogió un tiempo de tres semanas después del alzado en lugar de un meristemo parado porque es cuando se dan los primeros eventos que llevan a la parada de la proliferación.

Para identificar los genes diferencialmente expresados (DEGs) se calculó la tasa de cambio o *fold change* (FC), dividiendo los valores de RPKM (lecturas por millón de kilobases) de una muestra entre los de la otra muestra. Para poder interpretar con mayor facilidad la expresión diferencial de los diferentes genes, los valores de FC fueron transformados a una escala \log_2 , donde un FC de ± 1 equivale al doble de expresión de una muestra frente a la otra. También se aplicaron los tests estadísticos correspondientes al p-valor ajustado (p_{adj}) para tener un nivel de significatividad del cambio de expresión. Así se consideraron DEG aquellos genes que cumplían la siguiente condición: $\log_2 FC > 0,75$ o $< -0,75$ con un $p_{adj} < 0.05$.

Diez días después del alzado sólo 588 genes estaban diferencialmente expresados, 422 activados (UP) y 166 reprimidos (DOWN) en *spl-quad* a comparación de Col-0,

implicando un 72% de genes activados frente a un 28% de genes reprimidos. A tres semanas en cambio, había 1816 DEGs, 1438 activados y 378 reprimidos, es decir, un 80% de los DEGs estaban activados. Que hubiera una cantidad mucho mayor de DEGs activados (72% y 80% del total de DEGs a 10 días y tres semanas después del alzado, respectivamente) cuando se mutan los genes *SPL-ANQ* apoyaba nuestra teoría de que estos genes actúan como represores. Además, que hubiera el triple de DEGs a tres semanas del alzado con respecto a 10 días del alzado apoyaba también la idea de que los genes *SPL-ANQ* son importantes en la fase final del desarrollo.

Al realizar una comparación entre ambos listados de DEGs, observamos que 1595 DEGs cambiaban exclusivamente a las 3 semanas, frente a los 367 DEGs exclusivos de los 10 días (**Fig. C1.17A**). De los 221 genes coincidentes, 66 funcionan de forma contraria a los 10 días después del alzado y 3 semanas después del alzado, es decir, cambia su regulación con la edad (**Fig. C1.17A**), esto puede deberse a que cambie la regulación de éstos por efectos indirectos o por una actividad distinta de los *SPL-ANQ* ya sea por contexto o por cambios posttraduccionales, aunque esto es tan solo especulativo. Los 155 DEGs que cambian de igual manera en el tiempo pueden ser genes que tienen funciones más generales. Como el estadio que nos resulta de interés en este trabajo es el de tres semanas y además es donde se observan más cambios, decidimos centrarnos en el análisis de estos 1595 DEGs exclusivos del RNA-seq a tres semanas.

De los 1595 DEGs, 1276 estaban activados y 319 reprimidos en el cuádruple mutante. Con esta lista de genes diferencialmente expresados, realizamos un análisis de *Gene Ontology* (GO) usando la herramienta BiNGO (Maere et al., 2005) implementado por Cytoscape (Shannon et al., 2003), enfocándonos en los términos enriquecidos en la categoría Proceso Biológico. Para los 1276 DEGs activados, encontramos 40 categorías sobrerrepresentadas, destacando la respuesta a estímulos (206 genes) y estrés (110 genes) (**Fig. C1.17B**). En la categoría de respuesta a estímulos destacaba la respuesta a hormonas como el ácido jasmónico (24 genes) o giberelinas (18 genes). La categoría de respuesta a estrés incluía la respuesta a frío (6 genes) y a privación del agua (24 genes). Otras categorías sobrerrepresentadas en menor medida fueron proceso de biosíntesis de antocianinas (6 genes), reproducción sexual (10 genes), morfogénesis del carpelo (3 genes) y establecimiento de la pared del polen (5 genes).

Para los 319 DEGs reprimidos, fueron 64 las categorías sobrerrepresentadas (**Fig. C1.17C**). De ellas, destacaron dos grupos relacionados con ciclo celular (11 genes), regulación de procesos biológicos (44 genes). Dentro de ciclo celular destacaron las

categorías de organización de cromosomas (13 genes) y la fase M del ciclo celular (9 genes). Dentro de regulación de procesos biológicos destacamos la regulación de la transcripción (37 genes). Además, hubo enriquecimiento en categorías que afectan a procesos de desarrollo, que incluían mantenimiento del meristemo (6 genes) y desarrollo floral (12 genes).

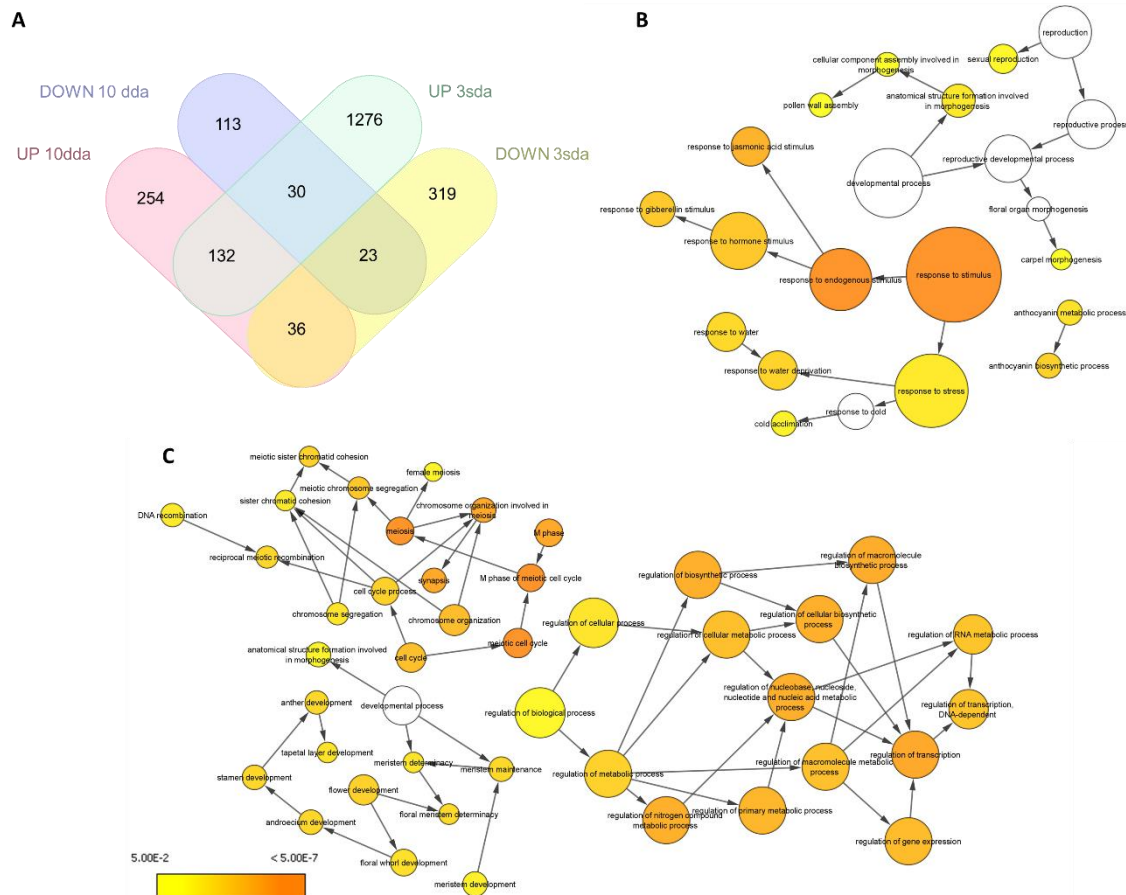


Figura C1.17. Categorías GO enriquecidas para los DEGs en meristemas del mutante *spl-quad* frente al genotipo silvestre a tres semanas del alzado. (A) Diagrama de Venn comparando genes activados (UP) y reprimidos (DOWN) en *spl-quad* diez días después del alzado y 3 semanas después del alzado. (B) Esquema de las categorías GO sobrerrepresentadas de los 1276 DEGs activados únicamente a tres semanas en *spl-quad*. (C) Esquema de las categorías GO sobrerrepresentadas de los 319 DEGs reprimidos únicamente a tres semanas en *spl-quad*. En ambos esquemas se utilizaron filtros de $\text{Log}_2\text{FC} > 0,75$ y $< -0,75$ y $p\text{-adj} < 0.05$. El tamaño del círculo es proporcional al número de genes, y el color de cada círculo representa el valor P de enriquecimiento (prueba hipergeométrica) para la etiqueta del término GO en ese círculo, donde el naranja representa el enriquecimiento más alto y el amarillo el enriquecimiento más bajo por encima del límite. Se eliminaron algunas categorías y la distancia entre nodos se arregló manualmente para optimizar la legibilidad. La figura y el análisis estadístico se generaron utilizando el software BiNGO.

En cuanto a los 155 DEGs comunes a los 10 días después del alzado y tres semanas después del alzado, un análisis de todos ellos en conjunto sin diferenciar activados de reprimidos nos hizo ver que la mutación de los genes *SPL-ANQ* afectaba ciertos aspectos a

lo largo de todo el desarrollo. Destacaron las siguientes categorías: respuesta a hormonas (17 genes), respuesta a estrés (24 genes), ritmo circadiano (7 genes) y respuesta a radiación (10 genes). Dentro de la respuesta a hormonas, se incluía la respuesta a auxinas (11 genes) y a giberelinas (5 genes); dentro de respuesta a estrés la respuesta a frío (9 genes) y estrés salino (7 genes); y dentro de la respuesta a radiación genes relacionados con la transición de fase vegetativa a reproductiva (4 genes) (Fig. C1.18).

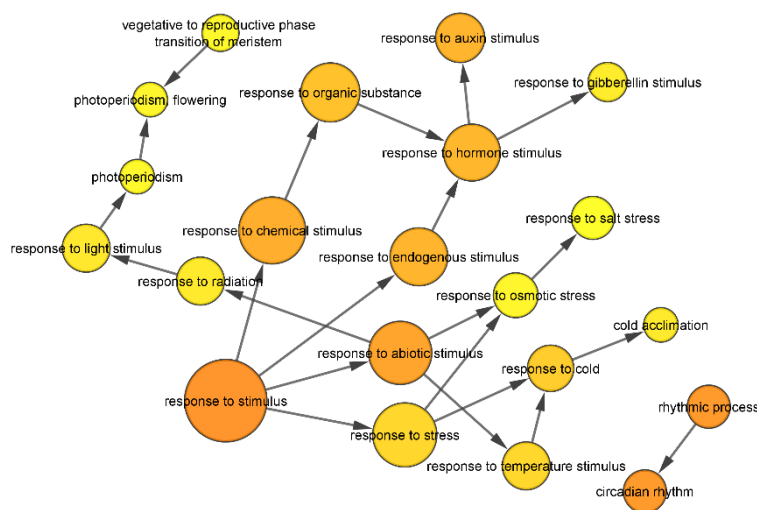


Figura C1.18. Categorías GO enriquecidas para los DEGs en meristemos del mutante *spl-quad* frente al genotipo silvestre que se mantienen a lo largo del desarrollo floral. Esquema de las categorías GO sobrerrepresentadas de los 155 DEGs que se ven afectados de igual manera (activados o reprimidos) a diez días y tres semanas después del alzado, son genes que en principio no dependen de la edad de la planta para verse afectados por la mutación de los genes *SPL*. Se utilizó el filtro de $\text{Log}_2\text{FC} > 0,75$ y $< -0,75$ y $p\text{-adj} < 0,05$. El tamaño del círculo es proporcional al número de genes, y el color de cada círculo representa el valor P de enriquecimiento (prueba hipergeométrica) para la etiqueta del término GO en ese círculo, donde el naranja representa el enriquecimiento más alto y el amarillo el enriquecimiento más bajo por encima del límite. Se eliminaron algunas categorías y la distancia entre nodos se arregló manualmente para optimizar la legibilidad. La figura y el análisis estadístico se generaron utilizando el software BiNGO.

Este análisis indicaba que la mutación de los genes *SPL-ANQ* afectaba a múltiples respuestas, especialmente relacionadas con respuesta a estrés, desarrollo y regulación de la transcripción, al final del desarrollo floral, y estrés, fotoperiodo y hormonas durante todo el desarrollo.

Puesto que nuestro objetivo principal era entender el papel de los genes *SPL* en el meristemo, y su posible relación funcional con la ruta FUL-AP2 descrita por Balanza et al. (2018) que controla la parada proliferativa, realizamos un análisis adicional comparando nuestros datos con los obtenidos por Martínez-Fernández et al. (2020) en los que se realizó una inducción del gen *AP2* en plantas que estaban próximas a la parada proliferativa (3 semanas después del alzado, un estadio similar al de nuestro experimento). Esta

comparación nos debería proporcionar información sobre las vías comunes reguladas por los factores *SPL-ANQ* estudiados y los relacionados con la ruta FUL-AP2. En este caso, al considerar a los *SPL* como represores de la parada proliferativa, comparamos los genes reprimidos por la inducción de *AP2* con los genes activados por la mutación de los genes *SPL-ANQ*, y los genes activados por la inducción de *AP2* con los genes reprimidos por la mutación de estos genes *SPL-ANQ*, al ser ambos procesos contrarios. Para esta comparación utilizamos el listado completo de los 1816 DEGs de *spl-quad* tres semanas después del alzado para no perder información.

Al cruzar ambos listados de genes, observamos que sólo un 14.65% de los DEGs en *spl-quad* (266 genes en total) se comparten con los DEGs en respuesta a la inducción de *AP2*. De los 266 genes presentes en ambos estudios, 201 genes presentaban los patrones contrarios esperados: 185 se activaban en *spl-quad* mientras se reprimían con la inducción de *AP2* y 16 se reprimían en *spl-quad* mientras se activaban con la inducción de *AP2* (**Fig. C1.19A**). Para comprender mejor que tipos de procesos estaban afectados en común se volvió a realizar un análisis de *Gene Ontology* con este grupo de genes.

De los 185 genes activados en *spl-quad* y reprimidos en *AP2ind*, 27 fueron las categorías sobrerrepresentadas. Entre ellas la más importante fue respuesta a estímulo (52 genes) dentro de la cual se encontraba respuesta a estrés (36 genes), respuesta a estímulo abiótico (26 genes) y respuesta a estímulo endógeno (15 genes). Dentro de respuesta a estímulo abiótico nos encontramos la respuesta a luz (11 genes), dentro de la de respuesta a estrés nos encontramos respuesta a frío (10 genes) y privación de agua (10 genes) y dentro de respuesta a estímulo endógeno estaba la respuesta a ácido abscísico (7 genes) (**Fig. C1.19B**).

De los 16 genes reprimidos en *spl-quad* y activados en *AP2ind*, fueron 28 las categorías sobrerrepresentadas con poca relación entre sí y pocos genes involucrados en cada una, de las que destacaríamos: la biosíntesis de L-metionina (1 gen), la cohesión de las cromátidas hermanas durante la meiosis (1 gen), la organización de la pared celular (2 genes), morfogénesis (2 genes) y la biosíntesis de inositol (1 gen) (**Fig. C1.19C**).

De estos resultados era especialmente interesante la coincidencia en genes relacionados con la respuesta a ácido abscísico, así como a frío y privación de agua, donde también se ha descrito que la señalización por ABA es importante para conferir resistencia a estos estreses en *Arabidopsis* (Ali, et al., 2022; Bray, 2002; Fernando et al., 2016). Todas estas categorías presentaban en común a los genes *KIN1*, *LTI30* y *LTI78/RD29A* (**Tabla C1.1**). Anteriormente ya se había descrito que *SPL1* y *SPL12* confieren termotolerancia en

la etapa reproductiva a través de la respuesta a ABA, de acuerdo con nuestros resultados, y que SPL1 se une al promotor de *LT178/RD29A* (Chao et al., 2017).

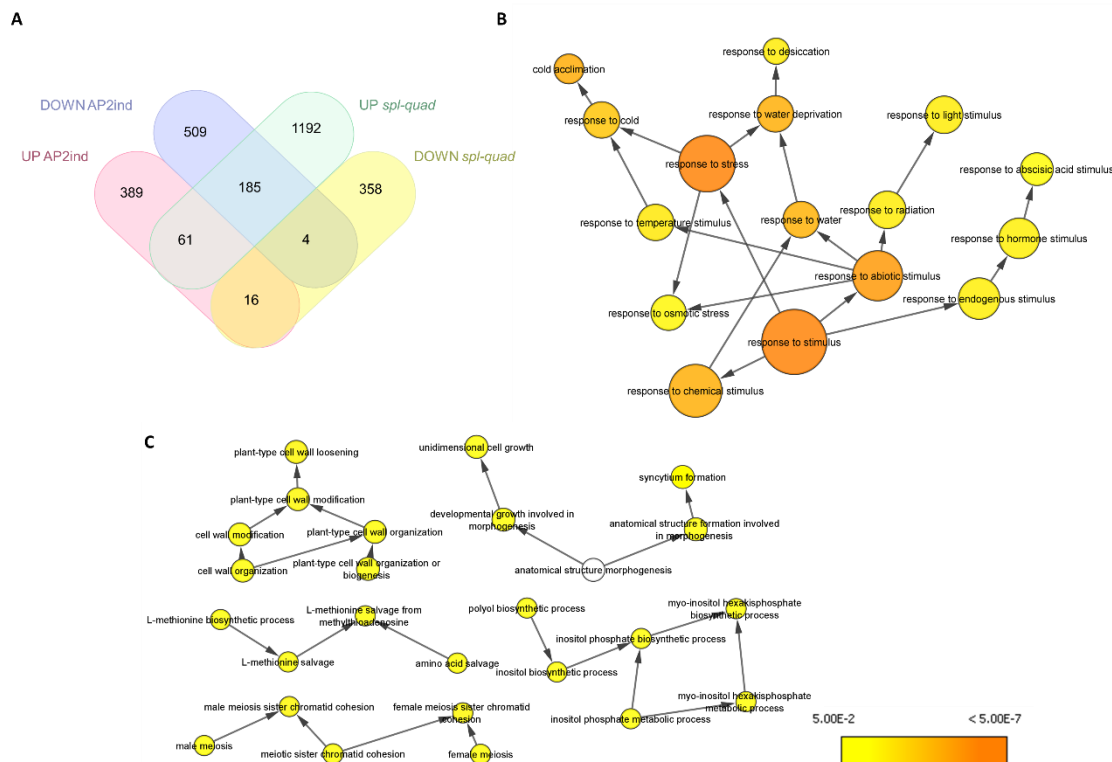


Figura C1.19. Comparación de DEGs en *spl-quad* y AP2ind. (A) Diagrama de Venn comparando genes activados (UP) y reprimidos (DOWN) en *spl-quad* y AP2ind, al ser procesos contrarios, analizamos aquellos genes que se comportan de manera antagónica. (B) Esquema de las categorías GO sobrerrepresentadas de los 185 DEGs activados en *spl-quad* y reprimidos en AP2ind. (C) Esquema de las categorías GO sobrerrepresentadas de los 16 DEGs reprimidos en *spl-quad* y activados en AP2ind. En ambos esquemas se utilizaron filtros de $\text{Log}_2\text{FC} > 0,75$ y $< -0,75$ y $p\text{-adj} < 0,05$. El tamaño del círculo es proporcional al número de genes, y el color de cada círculo representa el valor P de enriquecimiento (prueba hipergeométrica) para la etiqueta del término GO en ese círculo, donde el naranja representa el enriquecimiento más alto y el amarillo el enriquecimiento más bajo por encima del límite. Se eliminaron algunas categorías y la distancia entre nodos se arregló manualmente para optimizar la legibilidad. La figura y el análisis estadístico se generaron utilizando el software BiNGO.

Estos resultados sugerían que los genes *SPL* podrían estar promoviendo la parada de la proliferación a través de la ruta del ácido abscísico. Es interesante notar que Martínez-Fernández et al. (2020) hipotetizaron también que el ABA podría ser un factor clave en el control de la parada de la proliferación aguas abajo de *AP2*.

Por otra parte, miramos en los dos RNAseq los genes que resultaban de interés por su relación con *FUL*, con la ruta *FUL-AP2*, que se observan en la base de datos de interacciones para *SPL1* y *SPL14* (ePlant, <http://bar.utoronto.ca/eplant/>) o relacionados con los genes *SPL* regulados por miR156, para ver si actúan de manera similar en el clado *SPL-ANQ* (Tabla C1.2).

Entre ellos destacaron los genes *HB21* y *HB40*, que son responsables de la respuesta a ABA en meristemos axilares (González-Grandío et al., 2017) y que se caracterizaron en el siguiente capítulo de este trabajo.

Tabla C1.1. Listado de DEGs activados en *spl-quad* y reprimidos en AP2ind relacionados con estrés.

	Identificador	Símbolo del gen
Respuesta a ABA	AT1G71030	MYBL2
	AT2G35940	BLH1
	AT4G37260	MYB73
	AT5G52310	LTI78/RD29A
	AT3G50970	LTI30
	AT5G15960	KIN1
	AT5G66880	SNRK2.3
Respuesta a frío	AT3G25770	AOC2
	AT2G38170	CAX1
	AT5G20250	DIN10
	AT5G52310	LTI78/RD29A
	AT3G50970	LTI30
	AT5G15960	KIN1
	AT4G25480	DREB1A
	AT2G42540	COR15A
	AT1G55920	SERAT2;
	AT1G20620	ROG1
Respuesta a privación de agua	AT2G18050	HIS1-3
	AT4G39090	RD19
	AT1G01470	LEA14
	AT3G02480	ABR
	AT5G52310	LTI78/RD29A
	AT1G52890	NAC019
	AT3G50970	LTI30
	AT5G15960	KIN1
	AT4G25480	DREB1A
	AT5G66880	SNRK2.3

También llamó la atención la fuerte sobreexpresión de *FT* y la represión de *SVP*, ya que ambos genes están relacionados con la expresión de *FUL* (ver Introducción) y podrían ser responsables de alguna manera de la parada proliferativa que observamos en *spl-quad ful*.

Los mutantes en los genes *SPL-ANQ* son insensibles al estrés por sacarosa

Los resultados observados en el RNAseq, unido al hecho de que ya habíamos observado previamente que el cuádruple mutante *spl-quad* parecía hipersensible a

factores de estrés como la sequía y el calor, sugería ser que los genes *SPL-ANQ* afectaran a la parada proliferativa a través de la ruta del ácido abscísico.

Tabla C1.2. Log2FC, padj y rpkm de genes de interés relacionados con SPL-ANQ.

Comp. Genotipos		<i>spl-quad</i> vs Col-0 10dda		<i>spl-quad</i> vs Col-0 3sda		Media rpkm			
ID	Gen	log2FC	padj	log2FC	padj	<i>spl-quad</i> 10dda	<i>spl-quad</i> 3sda	Col-0 10dda	Col-0 3sda
HB21	AT2G18550	0,87	0,02	1,16	0,00	4,50	43,15	2,34	19,39
HB40	AT4G36740	-	-	1,29	0,00	0,36	10,92	0,94	4,47
HB53	AT5G66700	-	-	0,14	0,73	0,71	3,59	0,83	3,27
NCED3	AT3G14440	-	-	0,49	0,30	0,54	9,08	0,20	6,50
FUL	AT5G60910	-0,09	0,50	0,22	0,04	42,28	64,34	43,15	55,34
AP2	AT4G36920	0,48	0,00	0,28	0,01	41,56	42,51	28,65	34,92
SNZ	AT2G39250	-	-	-	-	0,08	0,62	0,10	0,18
SMZ	AT3G54990	-	-	1,53	0,00	0,76	2,39	0,23	0,84
TFL1	AT5G03840	0,05	0,93	0,53	0,00	3,76	12,12	3,48	8,42
FT	AT1G65480	-	-	2,05	0,00	0,88	2,79	0,13	0,68
WUS	AT2G17950	0,67	0,00	0,54	0,00	5,67	8,52	3,41	5,85
FLC	AT5G10140	-	-	-	-	0,06	0,45	0,05	0,26
FD	AT4G35900	0,01	0,98	-0,07	0,75	10,09	5,28	9,61	5,55
LFY	AT5G61850	-0,56	0,00	-1,00	0,00	21,11	9,31	29,77	18,64
SOC1	AT2G45660	0,33	0,00	0,12	0,32	44,88	56,94	34,24	52,48
GI	AT1G22770	1,07	0,00	0,64	0,00	26,25	23,62	11,98	15,23
SEP3	AT1G24260	0,20	0,03	0,85	0,00	135,76	219,11	113,01	121,22
AP1	AT1G69120	-0,13	0,14	0,32	0,00	127,97	125,34	133,79	100,70
KNU	AT5G14010	-0,04	0,94	-1,78	0,00	5,19	0,91	5,10	3,14
CLV1	AT1G75820	-0,04	0,81	-0,13	0,33	15,30	12,97	15,01	14,15
CLV2	AT1G65380	-0,13	0,38	-0,08	0,65	10,46	9,59	10,97	10,11
CLV3	AT2G27250	-	-	-	-	0,41	0,35	0,54	0,18
SVP	AT2G22540	-0,43	0,01	-0,79	0,00	9,73	5,12	12,58	8,89
Interactores									
TPL	AT1G15750	-0,32	0,00	-0,08	0,43	70,47	58,94	84,22	62,50
TPR2	AT3G16830	-0,13	0,14	-0,07	0,61	44,48	42,06	46,43	44,07
TPR3	AT5G27030	0,01	0,95	-0,22	0,09	27,22	23,06	25,89	26,92
TPR4	AT1G04530	-0,25	0,00	-0,16	0,10	67,18	51,25	76,48	57,13
TCP7	AT5G23280	-0,08	0,66	0,24	0,07	24,25	26,14	24,51	22,17
TCP15	AT1G69690	-0,17	0,09	0,18	0,08	31,23	33,39	33,55	29,53
BBX26	AT1G60250	-	-	3,05	0,00	0,04	3,71	0,00	0,46
TCP21	AT5G08330	-0,28	0,09	0,20	0,30	26,45	21,66	30,70	18,86

*En rojo valores de padj no significativos, en celda roja genes reprimidos estadísticamente significativos, en celda verde genes sobreexpresados estadísticamente significativos.

Se ha descrito que las plantas que son mutantes deficientes en la señalización por ácido abscísico son menos sensibles al estrés por aumento de sacarosa durante la germinación (Sato et al., 2018). Con esto en mente, realizamos un experimento de sensibilidad a sacarosa incluyendo a plantas silvestres, el cuádruple mutante *spl-quad*, la línea sobreexpresora *35S::SPL14* de Patricia Ballester (Ballester, 2016) y un control mutante de la ruta de biosíntesis de ácido abscísico, *nced3-2*.

Sembramos todas las líneas en placas con MS y MS con 200mM, 250mM y 300mM de sacarosa y observamos su desarrollo en el tiempo, comparando los porcentajes de germinación y de desarrollo en todas las concentraciones de sacarosa.

En la **Figura C1.20** se muestra cómo el aumento en la concentración de sacarosa afectaba a la germinación de las semillas y al desarrollo de las plantas germinadas.

Conforme la concentración de sacarosa aumenta en el medio, el porcentaje de germinación en todas las líneas disminuía, considerando germinación a que se aprecie la raíz emergente. Esto se empieza a notar en las placas de 250mM y es especialmente evidente a concentración de 300mM (**Fig. C1.20A**). A 250mM de sacarosa todas las líneas excepto *spl-quad* veían reducida en un 10% aproximadamente su capacidad de germinación. A 300mM de sacarosa los efectos eran más evidentes: sólo un 40% de las plantas silvestres germinaron, frente al 22% de germinación en las plantas *35S::SPL14*, 68% de germinación en el control *nced3-2* y 80% de germinación de *spl-quad* (**Fig. C1.20A**).

Por otra parte, a pesar de que los porcentajes de germinación no eran muy diferentes en 200mM o 250mM de sacarosa, si clasificamos las plantas por su grado de desarrollo, se podían observar más diferencias que al cuantificar solamente el porcentaje de germinación (**Fig. C1.20B**). En plantas crecidas con una concentración de sacarosa a 200mM el porcentaje de germinación fue similar en todas las líneas, pero ya se observaba que el desarrollo de las plántulas Col-0 y *35S::SPL14* se veía reducido por el aumento del azúcar, habiendo semillas que germinaban sólo hasta producir raíces o cotiledones, sin completar su desarrollo hasta formar hojas verdaderas. A 250mM, había sólo un 10% de diferencia en el porcentaje de germinación, pero el cambio en el grado de desarrollo ya cambiaba drásticamente entre las distintas líneas: sólo las líneas *spl-quad* y *nced3-2* conseguían desarrollarse hasta producir hojas verdaderas y en un porcentaje amplio, un 77% y un 70% respectivamente. Por el contrario, las líneas Col-0 y *35S::SPL14* a 250mM no llegaban a producir hojas verdaderas y sólo un 20% y un 30%, respectivamente conseguían producir

cotiledones, mientras que el resto de plantas germinadas sólo producían raíces (Fig. C1.20B).

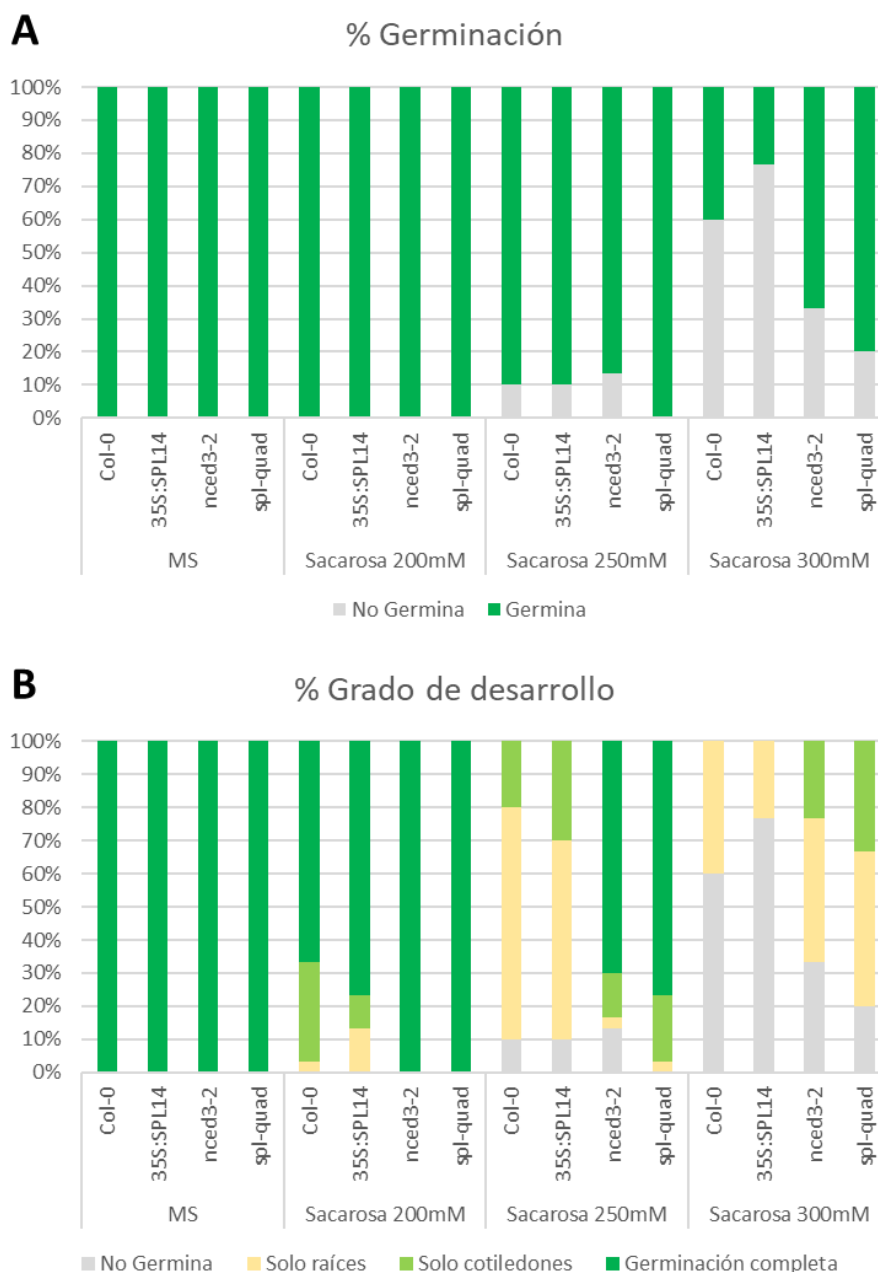


Figura C1.20. Porcentaje de germinación y grado de desarrollo de plantas Col-0, *spl-quad*, *35S::SPL14* y *nced3-2* en placas suplementadas con distintas concentraciones de sacarosa. (A) Porcentaje de germinación de plantas Col-0, *spl-quad*, *35S::SPL14* y *nced3-2*, conforme aumenta la concentración de sacarosa disminuye el porcentaje de germinación en las líneas sensibles (Col-0 y *35S::SPL14*). (B) Porcentaje de plantas en distinto grado de desarrollo, se distinguió entre semillas sin germinar (gris), semillas que producen únicamente raíces (amarillo), semillas que producen cotiledones (verde claro) y semillas que producen hojas verdaderas (verde oscuro). A mayor concentración de sacarosa, el grado de desarrollo disminuye viéndose menos afectadas las líneas mutantes *spl-quad* y *nced3-2*.

A 300mM de sacarosa las pocas plantas Col-0 y *35S::SPL14* que germinaron sólo produjeron raíces, mientras que las otras dos líneas, además de tener un mayor porcentaje de germinación, continuaron desarrollándose en mayor medida. La línea *nced3-2* desarrollaba cotiledones en un 23% y la línea *spl-quad* en un 33%.

En la **Figura C1.21** podemos observar cómo tras 10 días en las mismas condiciones de crecimiento se podían apreciar diferencias en germinación y desarrollo entre los distintos genotipos cuando se germinaban en MS o en MS suplementado con 250mM de sacarosa. Se escogió la concentración de 250mM debido a que es aquella concentración en la que las plantas más insensibles al incremento en sacarosa llegaban a producir hojas verdaderas. La línea mutante *spl-quad* es la que consiguió germinar y desarrollarse mejor, de manera similar al control *nced3-2*, que posee la ruta de síntesis de ácido abscísico afectada (**Fig. C1.21**).

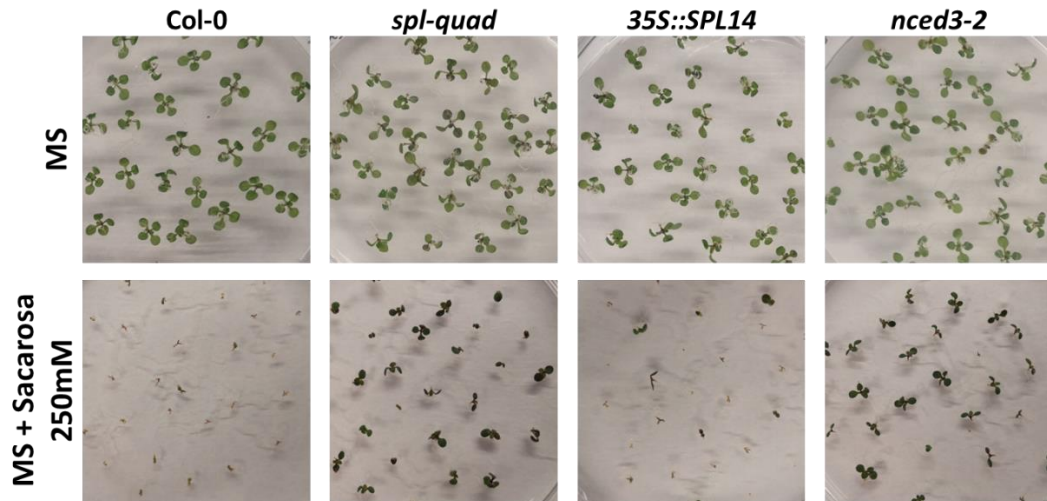


Figura C1.21. Crecimiento en placas MS con 250mM de sacarosa de plantas Col-0, *spl-quad*, *35S::SPL14* y *nced3-2*. En la fila superior se observa el crecimiento normal de todas las líneas en medio MS con sacarosa en concentraciones óptimas para el crecimiento. En la fila inferior se observa el crecimiento de cada línea en medio suplementado hasta 250mM de sacarosa, concentración que ya afecta al crecimiento de la planta, excepto en las líneas mutantes *spl-quad* y *nced3-2* que muestran insensibilidad a la sacarosa durante la germinación.

Por tanto, la línea *nced3-2* y la línea *spl-quad* mostraron una mayor insensibilidad al incremento de sacarosa en el medio que las plantas silvestres. A pesar de que este hecho no prueba que los genes *SPL-ANQ* tengan que estar afectando necesariamente a la ruta del ácido abscísico, la similitud entre los resultados obtenidos en la línea *nced3-2* y la *spl-quad* es suficiente para que merezca la pena explorar esta posible vía de regulación de la parada proliferativa.

Discusión

Como ya se ha mencionado en la introducción, los genes de la familia *SPL* han sido estudiados en la transición floral como unos factores de transcripción pertenecientes a la ruta dependiente de la edad, donde se ven regulados por miR156, que disminuye conforme se acerca la transición floral mientras que los genes *SPL* regulados por él aumentan su expresión (Cardon et al., 1999; Schmid et al., 2005; Wu et al., 2006). Sin embargo, poco se sabe de la función de los genes *SPL* a partir de la transición floral, y menos aún de los genes que no están regulados por el miR156, por lo que nosotros nos centramos en el estudio de los genes *SPL* no regulados por miR156 que contienen dominios de anquirina: *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16*.

Al analizar las bases de datos disponibles para Arabidopsis (Arabidopsis ePlant: <http://bar.utoronto.ca/eplant/>) se observa que los genes *SPL* se expresan, de acuerdo con su papel promotor de la transición floral, en el meristemo inflorescente, aumentando tras el alzado (**Fig. D1.1**); (Schmid et al., 2005). Desafortunadamente, la información disponible durante etapas de desarrollo posteriores a la transición floral es más escasa. En estudios transcriptómicos masivos comparando meristemos inflorescentes activos y parados se observa que la mayoría de los genes *SPL* se continúan expresando tras la transición floral (*SPL1*, *SPL14*, *SPL5*, *SPL7*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL12*, *SPL14*, *SPL15* y *SPL16*) (Wuest et al., 2016) (**Fig. I.8A**), y que los genes *SPL1*, *SPL12*, *SPL4* y *SPL16* aumentaban significativamente sus niveles de expresión en meristemos parados frente a meristemos proliferativos, mientras que el resto o no cambia, o se reduce su expresión, como en los genes *SPL9* y *SPL15* (**Fig. I.8A**).

Resultados previos del laboratorio mostraban que tanto *SPL1* y como *SPL14* eran capaces de unirse al promotor de *FUL*, comportándose como activadores, en ensayos de activación transitoria en hojas de *N.benthamiana* (**Fig. I.8B**). Sin embargo, al mutar los genes *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16* se observa un aumento de la expresión de *FUL* en etapas tardías de la fase reproductiva (**Fig. C1.11**), el adelanto en la parada de la proliferación (**Fig. C1.6**) y un cambio fenotípico en la morfología de los frutos que recuerda a la sobreexpresión de *FUL* (**Fig. C1.7**). Sorprendentemente, los datos obtenidos sugieren que los genes *SPL-ANQ* en etapas tardías del desarrollo inflorescente no actuarían como activadores de la expresión de *FUL*, sino que actuarían como represores. Analizando estos datos en conjunto podríamos hipotetizar que la actividad de los genes *SPL-ANQ* como reguladores de *FUL* dependerían del contexto biológico, dependiendo de los posibles interactores presentes en cada momento.

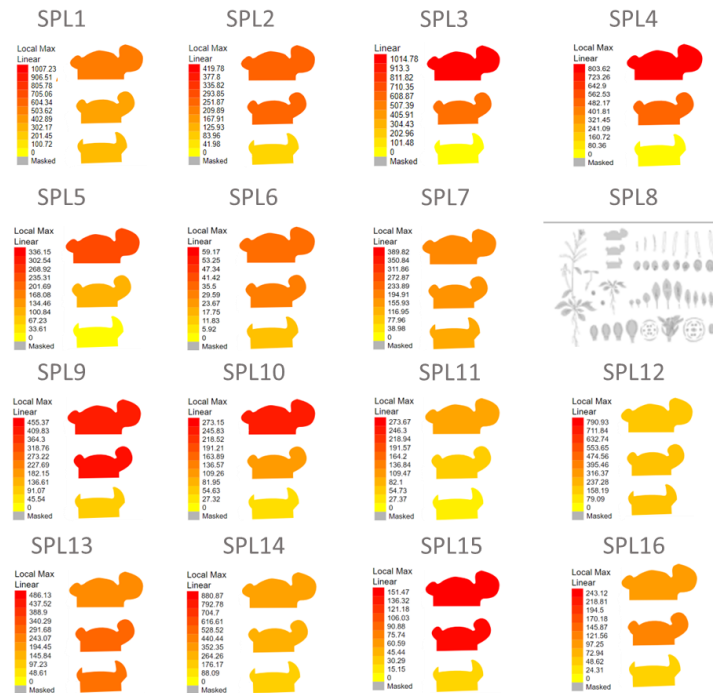


Figura D1.1. Expresión de los genes *SPL* en meristemo apical. De arriba abajo, meristemo apical inflorescente, meristemo apical en transición, meristemo apical vegetativo. En toda la familia génica los genes *SPL* se expresan en los primeros estadios florales, ya que la expresión del meristemo apical inflorescente es a los 21 días de la germinación, cercana al alzado de la floración. Figura adaptada de ePlant: <https://bar.utoronto.ca/eplant/>.

Al analizar la base de datos de interacciones proteína-proteína disponible en repositorios públicos (solo para *SPL1* y *SPL14*; <http://bar.utoronto.ca/eplant/>), encontramos que la proteína *SPL1* interacciona con la proteína *TOPELESS* (*TPL*) y las proteínas *TOPELESS*-related (*TPR*) *TPR2*, *TPR3* y *TPR4*, todas ellas proteínas descritas como correpresores transcripcionales (Causier et al., 2012). Los genes *TPL*, *TPR2*, *TPR3* y *TPR4* están relacionados con múltiples procesos biológicos como lo son la respuesta a auxinas, ácido jasmónico, mantenimiento del meristemo y respuesta de defensa (Causier et al., 2012). Causier *et al.* (2012), además mencionan que estos correpresores tienen alta afinidad a los dominios *Zn-finger* presentes en todo el clado *SPL*, haciendo plausible que su interacción tenga significado biológico. La unión de las proteínas *SPL* estudiadas en este trabajo, o al menos la proteína *SPL1*, a *TPL*, *TPR2*, *TPR3* o *TPR4* podría explicar que actúen como represores en lugar de activadores en determinados contextos. Además, si únicamente fuera *SPL1* la proteína que se une a los correpresores, podría explicar por qué en los triples mutante *spl1 spl12 spl14* y *spl1 spl14 spl16* los fenotipos fueron más fuertes que en el triple mutante *spl12 spl14 spl16*.

La proteína *SPL14* interacciona con la proteína de la familia *B-BOX* *BBX26* y las proteínas de la familia de factores de transcripción *TCP* (*TEOSINTE BRANCHED1/*

CYCLOIDEA/ PROLIFERATING CELL FACTOR) *TCP7*, *TCP15* y *TCP21/CHE*. Los genes que codifican estas últimas tres proteínas, *TCP7*, *TCP15* y *TCP21/CHE*, están relacionados con ritmo circadiano, y se les ha atribuido un posible papel en división celular y crecimiento de *Arabidopsis*, probablemente a través de *FT* (Cubas et al., 1999; Ho Ho et al., 2014; Pruneda-Paz et al., 2009; Shutian, 2015). De hecho, la sobreexpresión de una fusión traduccional de *TCP7* al dominio represor SRDX da lugar a inflorescencias similares a las que observamos en *spl-quad ful-cr* (Aguilar-Martínez et al., 2015; **Fig. D1.2**). Aunque la expresión de *TCP7* no se ve afectada en nuestro análisis transcriptómico del mutante *spl-quad*, se ha descrito que *TCP7* regula a *SOC1* (Li et al., 2001), y *SOC1* a su vez regula a *FUL* a través de una cooperación con *SPL15* eliminando la marca H3K27me3 de *FUL* y permitiendo su transcripción (Hyun et al., 2016). Existe la posibilidad de que la suma de la mutación de *FUL* a la mutación de los genes *SPL-ANQ* en el quintuple mutante *spl-quad ful-cr* genere un efecto similar en los genes responsables de la formación de flores que la represión del gen *TCP7*, pero harían falta estudios para confirmar si hubiera alguna relación.

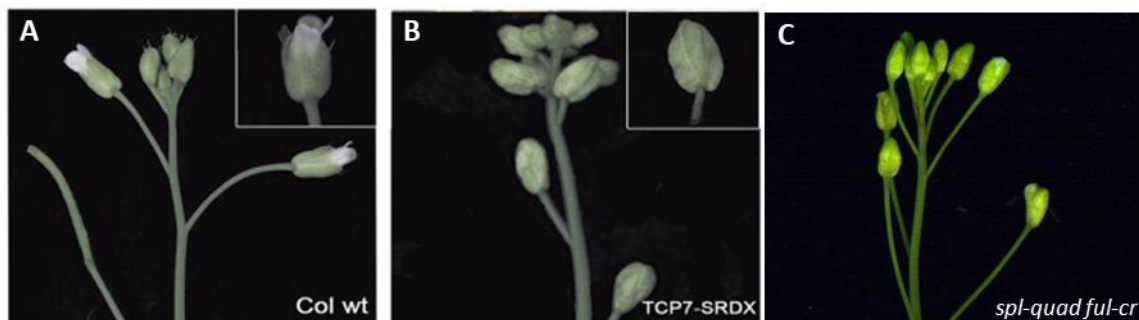


Figura D1.2. La represión del gen *TCP7* produce efectos similares en inflorescencias que el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*. La construcción *TCP7-SRDX*, que reprime *TCP7*, produce botones florales con problemas de apertura similares a los que encontramos en *spl-quad ful-cr*. *TCP7* podría funcionar conjuntamente con *SPL14* o tener una función similar a la de los genes *SPL-ANQ* en ausencia de *FUL*. Figura adaptada de Aguilar-Martínez et al., 2015.

Nuestros resultados sugerían que en el cuádruple mutante *spl-quad* el adelanto en la parada de la actividad del meristemo inflorescente se podía deber al incremento en la expresión de *FUL* observado. Sorprendentemente el quintuple mutante *spl-quad ful-cr* muestra una clara parada proliferativa, a diferencia del fenotipo característico del mutante *ful-2*, donde las plantas no paran de producir flores. El hecho de que el quintuple mutante no tenga el mismo fenotipo que *ful-2* en la parada proliferativa sugiere que los genes *SPL-ANQ* puedan regular la parada de la proliferación no sólo a través de *FUL* sino que haya otros genes implicados en la ruta que dependan de la expresión de los genes *SPL-ANQ*.

En el RNAseq realizado en este trabajo se compara el transcriptoma de ápices inflorescentes de *spl-quad* respecto a Col-0 tras 3 semanas después del alzado. En este tiempo, es cuando se empiezan a observar los primeros cambios moleculares en el meristemo inflorescente que marcan el inicio de la parada de la proliferación (Merelo et al., 2022). En la comparación realizada, los niveles de *FUL* empiezan a desregularse en el cuádruple mutante con un log2FC 0,21. los resultados del RNA-seq son similares a los obtenidos mediante qRT-PCR, donde también se observan pocas diferencias en los niveles de *FUL*, aunque las diferencias en meristemos parados son muy evidentes (Fig. C1.11). Curiosamente, en el RNA-seq sí que se observa un cambio significativo en los niveles de *FT*, que se encuentra significativamente sobreexpresado con un log2FC de 2,05. Sin embargo, a 10 días del alzado, ni en *FUL* ni en *FT* se observan cambios de expresión entre ambos genotipos, sugiriendo que la regulación ejercida por los genes *SPL* estudiados pudiera depender de la edad, siendo su efecto más evidente con el paso del tiempo. Al igual que ocurre con *FUL*, podríamos esperar que en la parada proliferativa la diferencia en la expresión de *FT* entre ambos genotipos fuera todavía mayor.

Como se ha mencionado en la introducción, *FT* es un florigeno que se trasloca desde las hojas al ápice durante la transición floral interaccionando con *FD* y activando a *SOC1*, promoviendo la producción de meristemos florales a partir de la regulación de *LFY*, *API* y *FUL* (Amasino, 2010; Skrikanth y Schmid, 2011). Existe entonces la posibilidad de que también tenga un papel en la transición de meristemo proliferativo a meristemo parado.

Se ha descrito que la sobreexpresión de un alelo del gen *SPL3* resistente a la regulación por miR156 produce un aumento en la expresión de *FT*, un aumento en la expresión de *FUL* y mayor tolerancia al cambio de temperaturas (Kim et al., 2012). En el mismo trabajo se mostraba que la mutación de *FUL* no afectaba a la sobreexpresión de *FT* si el gen *SPL3* estaba sobreexpresado. Además, *SPL3* es capaz de unirse directamente al promotor de *FT* en la zona más cercana a la región codificante, donde hay dos dominios GTAC juntos (tGTAC-aCTACa) de los diez dominios GTAC que posee *FT* en total (Kim et al., 2012). La respuesta observada por Kim et al. (2012) es muy similar a la que se describe en este trabajo al mutar los genes *SPL*: según nuestro RNAseq y las qRT-PCR realizadas, en *spl-quad* aumenta la expresión de *FT* y *FUL*.

El posible papel de *FT* en el control de la parada proliferativa de la inflorescencia se ha propuesto recientemente. En un trabajo aún no publicado de nuestro laboratorio se ha observado que la mutación de *FT* aumentaba la producción de frutos aumentando el tiempo que la planta produce flores (Sánchez Matilla, 2022). En este mismo estudio se

observó también que la expresión de *FUL* en el meristemo se reducía a la mitad cuando el gen *FT* se hallaba mutado, proponiendo que *FT* sea un activador de *FUL* (Sánchez Matilla, 2022).

Recientemente se ha publicado también que *FT* tiene un papel en la parada de la proliferación mediando la respuesta a los cambios de temperatura (González-Suárez et al., 2023). En este estudio observaron que la expresión de *FT* aumenta en hojas, silicuas y meristemo cuando se detiene la floración, además de ser dependiente de la temperatura: a mayor temperatura se expresa antes (y las plantas detienen su crecimiento antes). La mutación de *FT* genera un aumento en el número de frutos derivado de un aumento en el tiempo de la floración, mientras que la inducción de *FT* adelanta la parada disminuyendo el número de frutos producidos. Por último, vieron que los mutantes *ft* eran insensibles a los cambios de temperatura, produciendo los mismos frutos independientemente de si son más o menos elevadas.

Es interesante destacar aquí que también se ha descrito que los genes *SPL1* y *SPL12* actúan de forma redundante en las respuestas de termotolerancia (Chao et al., 2017), mostrando el doble mutante *sp1 sp12* una mayor sensibilidad al aumento de la temperatura. Los genes *SPL1* y *SPL12* confieren termotolerancia activando la expresión de los genes de respuesta a ABA *CEJ1*, *RD29A*, *RPK1*, *ABI2* y *RAS1*. Este estudio fue realizado en flores de una semana después del alzado, mientras que nuestro estudio se realizó en meristemo tres semanas después del alzado. En nuestro estudio, sólo *RD29A/LTI78* muestra una diferencia significativa en el RNA-seq, pero la respuesta observada es contraria a la descrita por Chao et al. (2017) ya que se muestra sobrerrepresentado (**Tabla C1.1**). Durante la etapa vegetativa ninguno de los genes de respuesta a ABA mencionados previamente se veían afectados por la mutación *sp1 sp12* (Chao et al., 2017). El hecho de que los genes *SPL* puedan ser tanto activadores como represores de *RD29A/LTI78*, sugiere nuevamente que dependiendo del contexto puedan actuar como activadores o represores. Esto podría explicar también el comportamiento en semilla, donde *sp1-quad* se comporta de igual manera que *nced3-2* de manera contraria a lo que esperaríamos según los resultados del RNA-seq. Habría que ampliar el estudio de estos genes en distintos tejidos para valorar si su acción activadora o represora depende de ello.

Nuestros datos indican que los genes *SPL-ANQ* están regulando negativamente a *FT* así como a *FUL*. En el meristemo apical al menos, es posible que estos genes regulen la respuesta a estrés ambiental (temperatura) mediante el control de la respuesta a ABA y *FT*. En el mutante *sp1-quad*, tanto la respuesta a ABA como los niveles de *FT* aumentan, ambos

procesos relacionados anteriormente con la parada de la proliferación (González-Suárez et al., 2023; Martínez-Fernández et al., 2020).

Tanto *FT* como *FUL* promueven la parada de la proliferación. En el mutante *ft* la parada se ve retrasada mientras que en el mutante *ful* la parada de la proliferación no ocurre. Con la mutación de los genes *SPL-ANQ*, se observa un claro aumento en la expresión de *FT*. El aumento de la expresión de *FT* mediado por la ausencia de los genes *SPL* podría entonces explicar la parada de la proliferación observado en el quintuple mutante *spl-quad ful-cr*, supliendo la ausencia de *FUL*. Se ha descrito también que *FT* regula al gen *AP1* y que *AP1* puede sustituir parcialmente la función de *FUL* (McCarthy et al., 2015). Así, el aumento de expresión de *FT* podría provocar un aumento de expresión de *AP1* y entre ambos poder suplir la mutación de *FUL* en *spl-quad ful-cr*. De acuerdo con esta hipótesis, en nuestro RNAseq la expresión de *AP1* se vio ligeramente inducida (log2FC: 0,31), aunque serían necesarios experimentos adicionales para confirmar esta idea.

Un regulador negativo de la expresión de *FT* es el factor *SVP*. *SVP* regula a *FT* para evitar la floración en condiciones de baja temperatura (Lee et al., 2007). Curiosamente, los niveles de *SVP* también se ven reducidos en el cuádruple mutante con respecto a Col-0 en el RNAseq realizado en este trabajo (log2FC: -0,79). De este modo, podemos hipotetizar que los genes *SPL-ANQ* estudiados en este trabajo pudieran regular la expresión de *FT* a través de *SVP*.

En resumen, los datos publicados y los obtenidos en este trabajo sugieren que los genes *SPL1*, *SPL12*, *SPL14* y *SPL16* pueden comportarse como activadores o represores dependiendo de la etapa de desarrollo y tejido en la que actúen. En el meristemo, este clado de genes *SPL* se comportarían como represores y su ausencia provocaría la sobreexpresión de genes de respuesta a abscísico y relacionados con la parada de la proliferación.

Proponemos que los genes *SPL* podrían regular la parada de la proliferación de diferentes formas distintas dependiendo del contexto (**Fig. D1.5**).

Mientras el meristemo se encuentra en un estado proliferativo, ni los genes *SPL-ANQ* ni *FUL* ni *FT* se expresan en el meristemo apical a niveles elevados, por lo que la expresión de *AP2* es alta y los niveles de ABA bajos, y no se produce la parada proliferativa (**Fig. D1.5A**).

Cuando el meristemo está cercano a la parada, en las plantas Col-0 se produce algún tipo de señal de la edad de momento desconocida que aumenta los niveles de expresión de *SPL-ANQ* y *FUL*. Las proteínas *SPL-ANQ*, unidas probablemente a un correpresor como

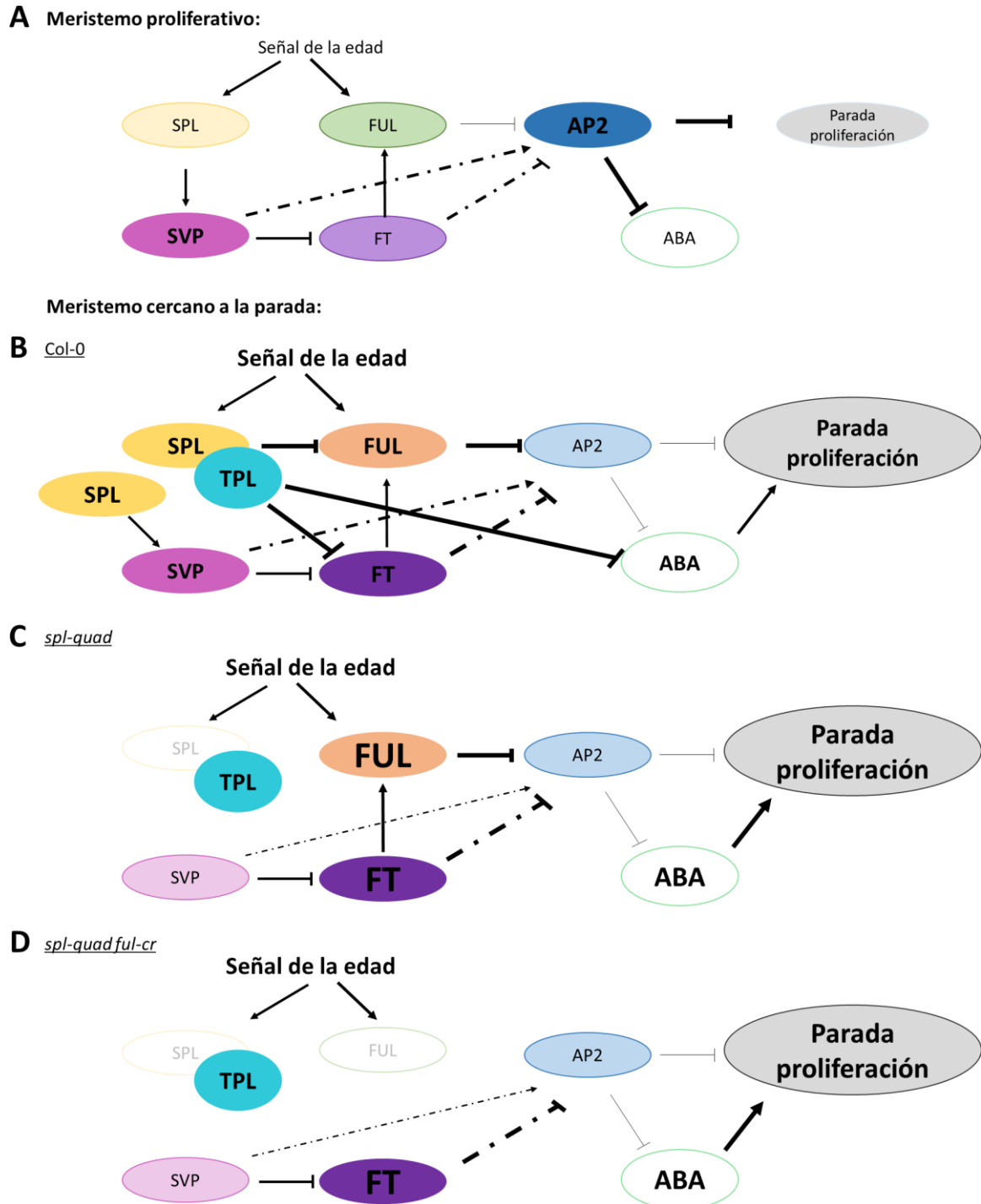


Figura D1.5. Modelo de ruta de *SPL-ANQ* en meristemo apical inflorescente. Los genes *SPL-ANQ* estarían regulando la parada de la proliferación ya sea mediante la ruta del ácido abscísico; mediante la modificación de la ruta *SVP/FT* ya sea activando *SVP* y/o reprimiendo *FT* y en consecuencia regulando *FUL*; o mediante ruta *FUL/AP2*. **(A)** Modelo de la ruta en meristemo proliferativo. **(B-D)** Modelo de la ruta en meristemo cercano a la parada, donde (A) es en un meristemo Col-0, (C) es en un meristemo *spl-quad* y (D) en un meristemo *spl-quad ful-cr*.

TPL, regulan los niveles de *FUL* y *FT* así como genes de respuesta a ABA, reprimiendo su expresión. Por otra parte, los factores SPL-ANQ activarían la expresión de *SVP* promoviendo la represión de *FT*. La expresión de *AP2* se reduce y se produce la parada proliferativa (**Fig. D1.5B**).

Al mutar los genes *SPL-ANQ* en el *spl-quad*, se elimina la represión de *FUL*, *FT* y genes de respuesta a ABA, así como la activación de *SVP*, lo que lleva a un aumento de *FUL* y *FT* aún mayor en el meristemo, así como la activación de genes de respuesta a ABA, dando lugar a una parada de la proliferación temprana (**Fig. D1.5C**).

Finalmente, al añadir la mutación *ful* al *spl-quad* dando lugar al quintuple mutante *spl-quad ful-cr*, los altos niveles de ABA y *FT* debidos a la ausencia de la actividad de las proteínas SPL-ANQ suplirían de forma directa o indirecta la función de *FUL* en el meristemo, reduciendo los niveles de *AP2* y produciendo una parada de la proliferación que no se produce en el mutante *ful* (**Fig. D1.5D**).

Nuestro trabajo contribuye a remarcar la importancia de los genes *SPL* no sólo como reguladores de la transición floral sino también como reguladores de la parada de la proliferación, siendo el inicio de una vía de investigación interesante para poder discernir mejor el papel de estos genes en el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis* y especialmente en la parada de la proliferación.

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned in the lower right quadrant of the page. The text 'CAPÍTULO 2' is centered over this splash.

CAPÍTULO 2

***HB21* se acumula en el ápice floral cerca de la parada de la floración**

El papel de *HB21*, junto con *HB40* y *HB53*, en el mantenimiento de la dormancia en meristemas axilares ya había sido descrito previamente en detalle (González-Grandío et al., 2016). Además, también se había sugerido que *HB21* podría participar en el control del final de la floración induciendo la parada proliferativa del meristemo inflorescente, que ha sido propuesta a su vez como un tipo de dormancia meristemática (Martínez-Fernández et al., 2020). Sin embargo, la relevancia de *HB21* durante este proceso de desarrollo todavía no estaba clara.

Para entender el papel de *HB21* durante la parada del meristemo inflorescente, decidimos estudiar su patrón de expresión en el ápice del tallo durante la etapa reproductiva usando la línea reportera *HB21pro:GUS* (González-Grandío et al., 2017). La señal GUS no se detectaba en el ápice inflorescente una semana después del alzado del tallo (sda; **Fig. C2.1A**), así como tampoco dos semanas después del alzado (**Fig. C2.1B**). A las tres semanas, cuando la capacidad proliferativa del meristemo inflorescente se reduce marcando el inicio de la parada, la señal GUS empezó a detectarse en la base de los primordios florales en el ápice inflorescente (**Fig. C2.1C**), siendo evidente a las cuatro semanas después del alzado y cuando el meristemo había detenido la producción de flores (**Fig. C2.1D-E**). Sorprendentemente, la señal GUS en ningún momento se detectó en el propio meristemo apical del tallo, quedando restringida a los primordios y las yemas florales (**Fig. C2.1A-E**)

Para determinar si la expresión detectada en el ápice estaba relacionada con la parada proliferativa del SAM y no se trataba de una mera correlación con la edad de la inflorescencia, decidimos introducir el reportero *HB21pro:GUS* en los fondos mutantes *ap2-170* y *ful-2*, en los cuales la actividad del meristemo inflorescente apical está extendida en el tiempo. *ap2-170* es un alelo resistente a la regulación por miR172 que presenta un retraso en la parada del meristemo probablemente causado por una mayor acumulación de proteína AP2 (Balanzà et al., 2018). Se ha demostrado que AP2 es un regulador negativo directo del gen *HB21* (Martínez-Fernández et al. 2020, Yant et al., 2010). El reportero *HB21pro:GUS* en el mutante *ap2-170* no se detectó durante las primeras tres semanas después del alzado del tallo (**Fig. C2.1F-H**). La señal GUS empezó a detectarse a las cuatro semanas después del alzado (**Fig. C2.1I**), una semana después de cuando apareció en la línea control en fondo silvestre (**Fig. C2.1C**). Cinco semanas después del alzado, cuando la parada del meristemo en el mutante *ap2-170* ya se ha producido, la señal fue fuerte y clara en esta línea (**Fig. C2.1J**), en un patrón similar al observado en la línea control cuatro semanas después del alzado (**Fig. C2.1D**). Este resultado sugiere que el retraso observado

en la parada del meristemo en el mutante *ap2-170* podría estar asociado con un retraso en la activación de *HB21* en el ápice inflorescente.

En el mutante *ful-2*, el meristemo inflorescente nunca experimenta una parada completa de la proliferación y la producción de flores continúa aunque a ritmos bajos durante muchas semanas después de que se haya producido la parada proliferativa en plantas silvestres (Merelo et al., 2022). En el mutante *ful*, la señal reportera no se detectó durante toda la fase reproductiva (Fig. C2.1K-N), y solo una señal GUS débil pudo ser observada varias semanas después del alzado (en el experimento mostrado en la figura, 11 semanas), cuando las plantas *ful* mostraban signos evidentes de senescencia general (Fig. C2.1O).

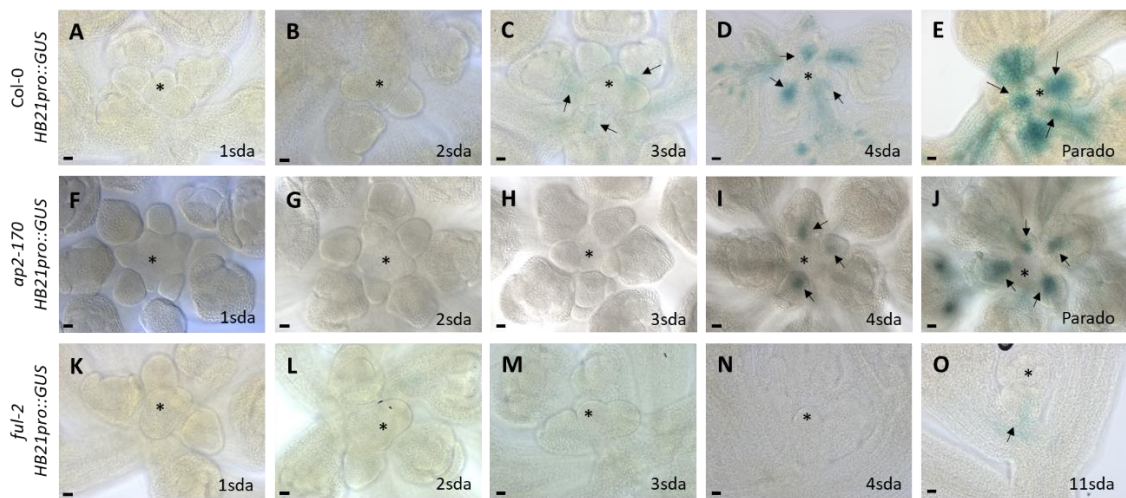


Figura C2.1. La expresión de *HB21* aumenta cerca del final de la floración. Detección histoquímica de la actividad GUS bajo el promotor *HB21* en el ápice de la inflorescencia de *Arabidopsis*. (A-E) Actividad del reportador *HB21pro:GUS* en el fondo Col-0 una semana después del alzado (A), dos semanas después del alzado (B), tres semanas después del alzado, cuando comienza a disminuir la capacidad proliferativa del meristemo, se detecta actividad débil del reportero (C), cuatro semanas después del alzado, cuando la expresión del reportero es más elevada (D) y en meristemos en parada proliferativa, donde la expresión de *HB21* alcanza su nivel máximo (E). (F-J) Patrón de expresión de *HB21pro:GUS* en el fondo *ap2-170* una semana después del alzado (F), dos semanas después del alzado (G), tres semanas después del alzado (H), cuatro semanas después del alzado, cuando comienza a detectarse (I) y en meristemos en parada proliferativa (J). (K-O) Patrón de expresión de *HB21pro:GUS* en fondo *ful-2* una semana después del alzado (K), dos semanas después del alzado (L), tres semanas después del alzado (M), cuatro semanas después del alzado (N) y a las once semanas después del alzado, cuando la planta está entrando en senescencia, aunque el meristemo del tallo sigue activo, y se puede detectar una expresión débil de *HB21* (O). Las puntas de flecha apuntan a los primordios florales. El asterisco marca el SAM. Sda= Semanas después del alzado del tallo. Barra = 20 μ m.

La parada de la proliferación del meristemo inflorescente está asociada con la represión de *WUS* en el meristemo apical del tallo, cuya expresión ya no puede detectarse en el momento de la parada. Para determinar precisamente cuándo *HB21* se acumula en el ápice, realizamos un análisis simultáneo de los patrones de expresión de *WUS* y *HB21* durante el desarrollo de la inflorescencia introduciendo un reportero *WUSpro:EGFP-WUS*

en la línea *HB21pro:GUS*. Se procesaron ápices individuales de modo secuencial para detectar mediante microscopía confocal la presencia de GFP-WUS y mediante detección histoquímica la actividad de *HB21pro:GUS*. Como ya se ha descrito previamente, el reportero GFP-WUS se detectó a niveles uniformes hasta las tres semanas después del alzado, cuando disminuyó para posteriormente desaparecer en meristemos en parada proliferativa a las cuatro semanas después del alzado (Fig. C2.2C,D ; Merelo et al., 2022). El descenso en la expresión de *WUS* a las tres semanas después del alzado coincidió con la expresión inicial de *HB21* (Fig. C2.2C,G), y la represión completa de *WUS* con la expresión más alta de *HB21* (Fig. C2.2D,H). La correlación negativa entre *WUS* y *HB21* apoya otra vez la idea de que *HB21* inicia su expresión cuando el meristemo apical del tallo entra en una fase de menor actividad proliferativa que lleva al cese de la floración, alcanzando su máximo cuando el meristemo para.

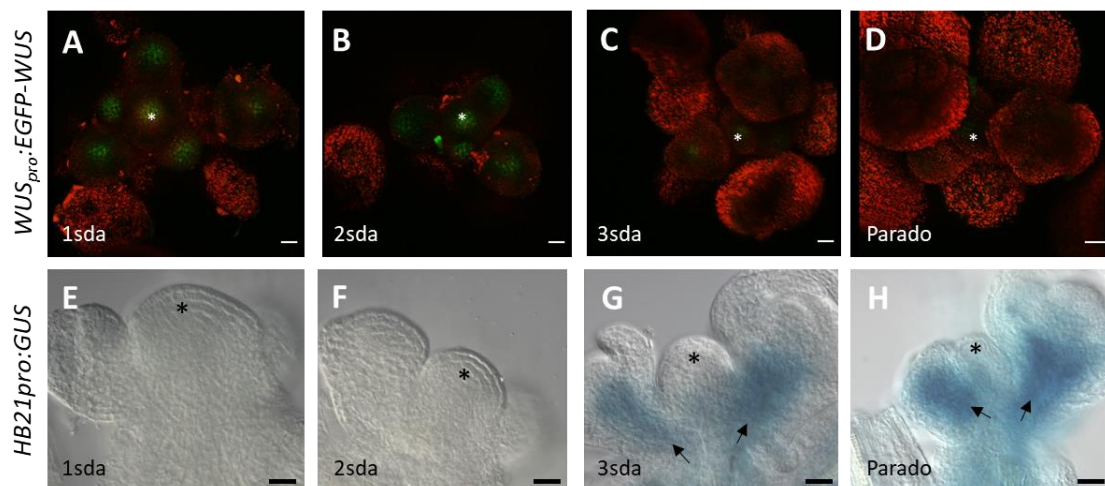


Figura C2.2. La acumulación de WUS correlaciona negativamente con la activación de HB21. Las líneas *WUSpro:EGFP-WUS* y *HB21pro:GUS* fueron analizadas, los mismos ápices fotografiados en el confocal fueron secuencialmente procesados para el análisis GUS. (A-D) Expresión de EGFP-WUS (verde) una semana después del alzado (A), dos semanas después del alzado (B), tres semanas después del alzado (C) y cuatro semanas después del alzado (en parada proliferativa) (D) (E-H) Detección histoquímica de la actividad GUS bajo el promotor de *HB21* una semana después del alzado (E), dos semanas después del alzado (F), tres semanas después del alzado (G) y cuatro semanas después del alzado (en parada proliferativa) (H). A las tres semanas cae la expresión de WUS (C) coincidiendo con la aparición de *HB21* (G), y en los meristemos parados la expresión de WUS no se detecta mientras que la actividad del promotor de *HB21* está en nivel máximo (D, H). Las flechas apuntan a los primordios florales. Los asteriscos marcan el SAM. Barra = 20 μ m.

***HB21* es capaz de inducir la parada del meristemo cuando se expresa en el SAM.**

La correlación negativa entre la actividad del meristemo inflorescente y la expresión de *HB21* sugeriría que la proteína *HB21* podría estar activando el estado de dormancia asociado a la parada de la proliferación al final del periodo de floración. Para comprobar esta hipótesis, generamos líneas inducibles para expresar *HB21* (*35Spro::LhGR*»*HB21*,

Moore et al., 2006; a partir de ahora llamadas HB21ind). Para su caracterización, utilizamos dos líneas independientes seleccionadas por su diferente respuesta al tratamiento con Dexametasona (Dexa) en hojas: la línea #7 (inducción fuerte) y la línea #21 (inducción suave). Tratamos los ápices principales dos semanas después del alzado, un estadio donde el meristemo está completamente activo, con una gota de Dexa o solución control (*mock*) y chequeamos las plantas cinco días después del tratamiento. Los ápices tratados con *mock* continuaban con su desarrollo normal, abriendo nuevas flores y elongando el tallo, mientras que los ápices tratados con Dexa mostraron diferentes fenotipos (**Fig. C2.3. A-C**). En la línea #21, de inducción suave, el tratamiento de Dexa provocó que los primordios florales detuvieran su desarrollo (**Fig. C2.3B**), uno de los eventos que ocurren durante el proceso de parada proliferativa al final de la floración (Walker et al., 2023). Sin embargo, la inducción de *HB21* en la línea #21 no mostró ningún efecto visible en la actividad del SAM, que permaneció activo produciendo nuevos primordios florales. Por otra parte, la línea #7, de inducción fuerte, mostró una clara respuesta al tratamiento con Dexa en todo el meristemo apical, induciendo la senescencia de los primordios florales y el cese de la actividad del meristemo (**Fig. C2.3C**). Este resultado indicaba que *HB21* era capaz de regular el desarrollo de la inflorescencia cuando se expresaba localmente en el ápice meristemático, afectando al progreso del desarrollo de las flores y la actividad del meristemo. Posteriormente combinamos la línea inducible *35Spro::LhGR»HB21* fuerte #7 con las mutaciones *ap2-170* y *ful-2*, que causan un retraso en la parada del meristemo y donde la expresión del gen *HB21* se encuentra reprimida. En el fondo *ap2-170*, la inducción de *HB21* a las dos semanas después del alzado generó dos tipos de fenotipos no observados en las plantas tratadas con *mock* (**Fig. C2.3D-F**). Algunas plantas mostraron sólo la parada del desarrollo de primordios florales observada tras el tratamiento con Dexa en la línea suave #21 en fondo Col-0 (**Fig. C2.3E**), mientras que el resto fueron capaces de parar tanto el crecimiento del SAM como producir la senescencia de las flores (**Fig. C2.3F**), aunque el efecto fue menos severo que el observado en las plantas de la línea fuerte #7 en el fondo Col-0 tratadas con Dexa (**Fig. C2.3C**). Sorprendentemente, en el mutante *ful-2* la inducción de *HB21* no afectó al desarrollo de la inflorescencia, y cinco días después del tratamiento con Dexa las plantas eran indistinguibles de las plantas control tratadas con *mock* (**Fig. C2.3G-I**). Los resultados obtenidos al inducir localmente *HB21* en el ápice inflorescente indicaban que *HB21* es suficiente para inducir la parada de las estructuras en desarrollo en el ápice floral, tanto en flores como el meristemo, y que estos fenotipos podrían ser dependientes del nivel de acumulación de *HB21*, pero también que la actividad de *FUL* parece ser necesaria para estas funciones.

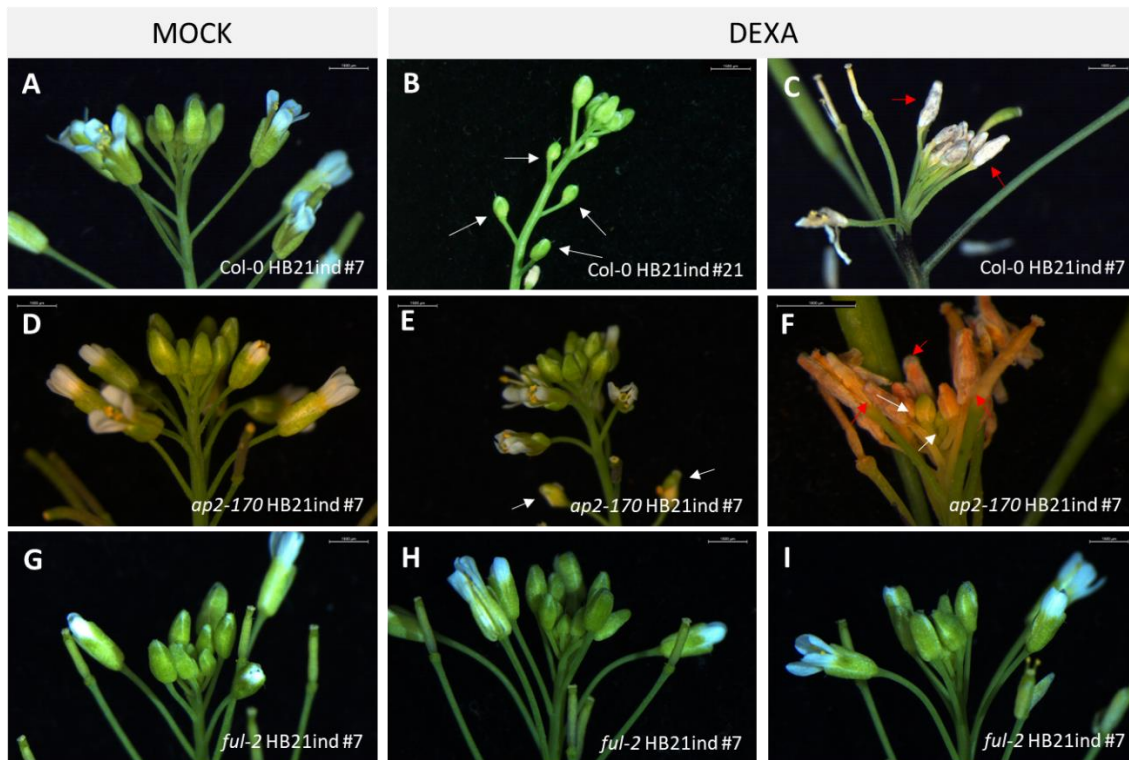


Figura C2.3. La inducción de *HB21* induce la parada de flores y del meristemo. Efecto de la inducción de *HB21* en inflorescencias proliferativas de plantas Col-0, *ap2-170* y *ful-2*, dos semanas después del alzado. (A) La línea inducible Col-0 HB21ind fuerte #7, tratada con *mock*, muestra un desarrollo normal. (B) La línea Col-0 HB21ind suave #21 tras el tratamiento con DEXA muestra primordios florales que han parado su desarrollo. (C) La línea Col-0 HB21ind fuerte #7 tras un tratamiento con DEXA muestra parada del meristemo, así como senescencia de las flores. (D) La línea inducible *ap2-170* HB21ind fuerte #7, tratada con *mock*, muestra un desarrollo normal. (E) La línea *ap2-170* HB21ind fuerte #7, tras el tratamiento con DEXA, muestra fenotipos más leves que en fondo silvestre, incluyendo la parada de los primordios florales. (F) La línea *ap2-170* HB21ind fuerte #7, donde el tratamiento con DEXA causa efectos fuertes, incluyendo la parada del meristemo inflorescente y primordios florales parados y senescentes. (G-I) Las líneas *ful-2* HB21ind #7 tratadas con *mock* (G) o DEXA (H, I) no mostraron efectos visibles del tratamiento. Las flechas blancas apuntan meristemos florales parados, las rojas apuntan primordios florales senescentes. Barra = 1,5mm.

Para comprobar si la severidad del fenotipo causado por la inducción de *HB21* dependía del grado de acumulación de este factor, se realizó un experimento en el que se comparó el efecto de un tratamiento con DEXA o tres tratamientos con DEXA en tres días consecutivos. Observamos que si bien la línea inducible fuerte #7 detenía su crecimiento desde la primera inducción (Fig. C2.4C), la línea inducible suave #21 necesitaba tres tratamientos para presentar un fenotipo similar al de la línea #7 inducida (Fig. C2.4H), lo que sugería que la detención de la actividad del meristemo apical es dependiente del nivel de acumulación de *HB21*.

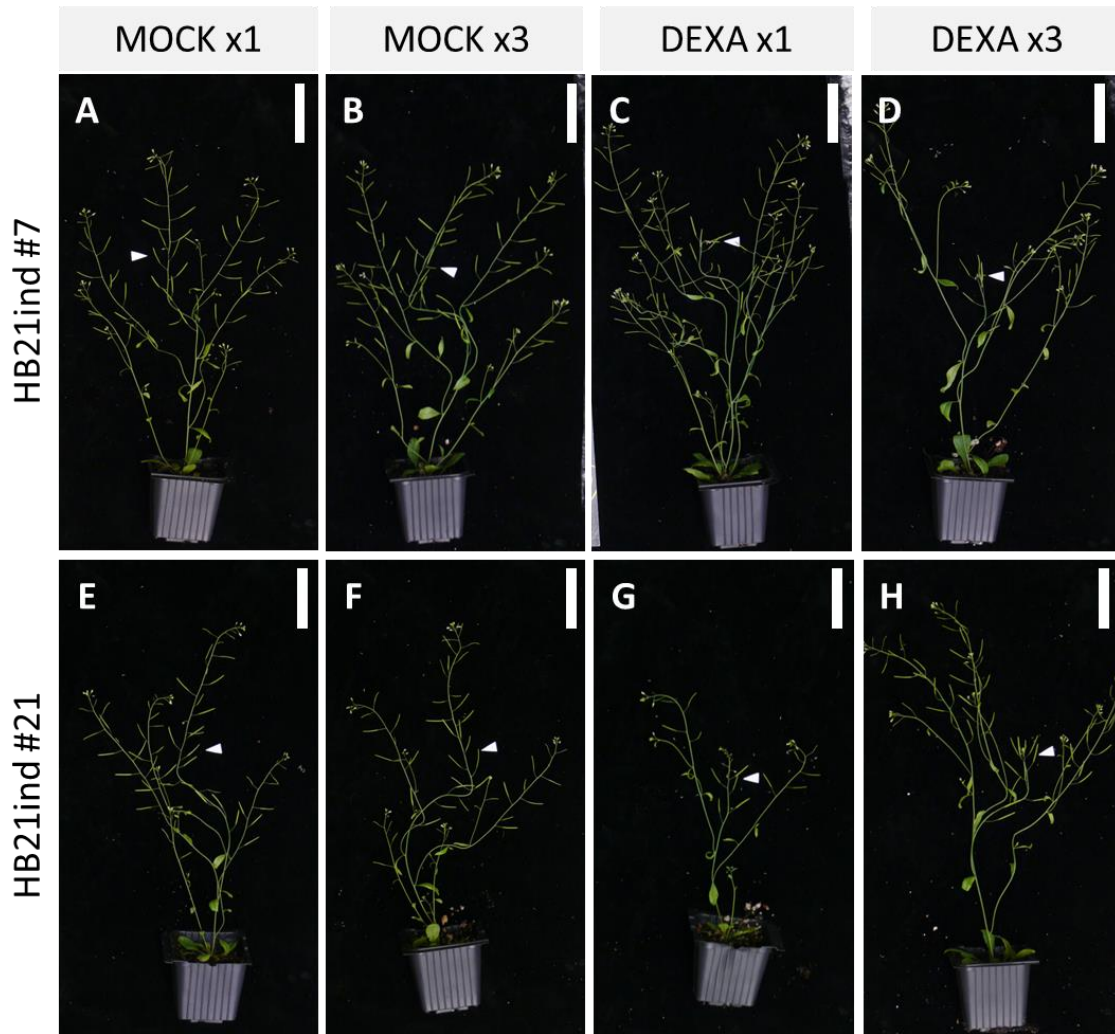


Figura C2.4. La parada del meristemo depende de la intensidad de la inducción de *HB21*. Efecto de la inducción de *HB21* en inflorescencias proliferativas de plantas Col-0, dos semanas después del alzado. **(A, B)** La línea inducible Col-0 *HB21ind* fuerte #7, tratada con uno y tres tratamientos *mock*, muestra un desarrollo normal. **(C,D)** La línea Col-0 *HB21ind* fuerte #7 tras un o tres tratamientos con Dexa, detiene su crecimiento. **(E,F)** La línea inducible Col-0 *HB21ind* débil #21, tratada con uno y tres tratamientos *mock*, muestra un desarrollo normal. **(G)** La línea inducible Col-0 *HB21ind* débil #21, tras un único tratamiento con Dexa muestra una reducción del desarrollo en la inflorescencia principal. **(H)** La línea inducible Col-0 *HB21ind* débil #21 después de tres tratamientos con Dexa muestra una parada del desarrollo en la inflorescencia principal. Las flechas señalan el punto de inicio de los tratamientos. Barra= 5cm.

***HB21* controla la parada del meristemo de manera redundante con *HB40* y *HB53*.**

Los transcritos de *HB21* se acumulan al final de la floración y su inducción en el ápice inflorescente es capaz de parar la actividad meristemática. De acuerdo con esto, se ha propuesto previamente que *HB21* podría modular el final de la floración promoviendo la parada del meristemo, lo cual apoya el fenotipo del mutante *hb21-2*(SAIL_790_D09.v1), que produce más flores antes de la parada de la inflorescencia que las plantas silvestres (Martínez-Fernández et al., 2020). Para caracterizar mejor el papel de *HB21* en la parada

de la floración decidimos caracterizar el fenotipo de un alelo adicional, *hb21-1* (WiscDsLox468G4), previamente descrito por su rol en la dormancia de las yemas axilares (González-Grandío et al., 2017). Ambos alelos mutantes están asociados a la inserción de un T-DNA en el tercer exón de los genes (Fig. C2.5), en una posición muy cercana (*hb21-1* en la posición 622 de la CDS y *hb21-2* en la posición 703).

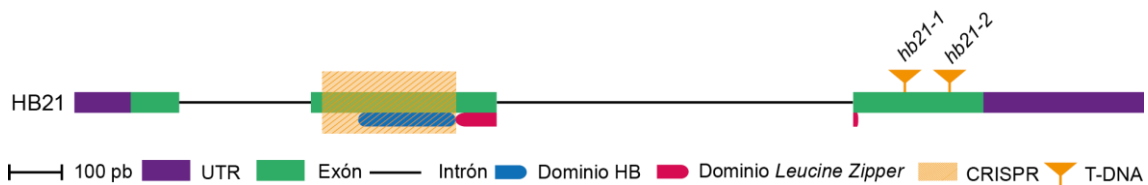
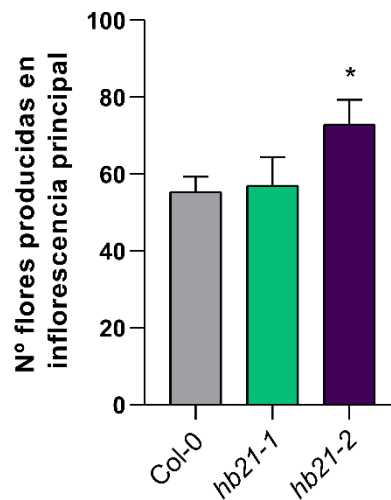


Figura C2.5. Diagrama del gen *HB21* según la información disponible en TAIR. La región codificante se representa en verde y las regiones 5'UTR y 3'UTR en morado. En azul se indica el dominio HB, en rosa el dominio *Leucine zipper* y en naranja la localización de cada inserción de T-DNA. La caja naranja representa la zona eliminada mediante CRISPR, que incluye todo el dominio HB.

Sorprendentemente, ambos alelos mostraron diferentes fenotipos relacionados con la parada de la floración. Las plantas Col-0 produjeron $55,38 \pm 3,73$ frutos, mientras que el mutante *hb21-1* produjo $57,07 \pm 7,15$, en contraste con los $72,93 \pm 6,10$ frutos producidos por el mutante *hb21-2* (Fig. C2.6). Como estos alelos parecían no ser nulos, y para descartar otros posibles modificadores que pudieran explicar la disparidad en el fenotipo de ambas líneas mutantes, decidimos generar un alelo mutante adicional por edición genómica CRISPR/Cas9 (Wang et al., 2015). Fuimos capaces de generar plantas con una delección de 244pb en el segundo exón del gen, eliminando por completo el homeodominio de unión a DNA, dando lugar a una proteína truncada (Fig. C2.5, secuencia de ambas proteínas en Anexo V). Llamamos a este nuevo alelo *hb21-3*.

Cuando comparamos el número de flores producidas antes de la parada del meristemo en el mutante *hb21-3* y las plantas Col-0, observamos una diferencia pequeña aunque significativa, produciendo $46,06 \pm 2,95$ y $41,83 \pm 1,94$ flores respectivamente (Fig. C2.7). Este análisis indicaba que la ausencia de *HB21* afecta al número de flores producidas antes de la parada aumentándolo en aproximadamente un 10%. Este incremento fue más leve en *hb21-3*, un mutante nulo, que en *hb21-2* (un aumento del 10% frente a un aumento del 30%). Esta observación sugería que el alelo *hb21-2* podría no ser un alelo nulo sino un alelo antimorfo, o que esta línea mutante podría llevar una inserción/mutación adicional responsable del fenotipo observado.



FiguraC2.6. Conteo de flores producidas en la inflorescencia principal en Col-0, *hb21-1* y *hb21-2* una vez producida la parada proliferativa. El mutante *hb21-2* produce un número de flores significativamente superior a *hb21-1* y Col-0. El asterisco señala diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,05$.

Trabajos anteriores donde se reporta la caracterización funcional de *HB21* indicaron que este gen actúa de manera redundante con otros dos genes, *HB40* y *HB53*, en el control de la dormancia de los meristemas axilares (González-Grandío et al., 2017). *HB40* y *HB53* también se acumulan al final de la floración, según los datos transcriptómicos previamente publicados (Wuest et al., 2016), y *HB53* también se reprime por la inducción de *AP2* en la inflorescencia de manera similar a *HB21* (Martínez-Fernández et al., 2020). Para evaluar si *HB21* podría actuar también redundantemente con *HB40* y *HB53* en el control de la parada de la floración, cuantificamos la acumulación de los transcritos de *HB21*, *HB40* y *HB53* durante la fase reproductiva en el ápice de la inflorescencia por qRT-PCR. Para ello, colectamos ápices inflorescentes de Col-0 y los mutantes *ap2-170* y *ful-2* correspondientes a los mismos estadios analizados en la detección de la actividad del reportero *HB21pro:GUS* descrito anteriormente, eliminando el mayor número de flores y yemas posibles. El transcrito de *HB21* mostró un claro incremento a tres semanas después del alzado, cuando comienza la parada del meristemo, alcanzando su máximo nivel en ápices de cuatro semanas después del alzado, cuando se produce la parada (Fig. C2.8A). En el mutante *ap2-170* el patrón de expresión de *HB21* fue similar al observado en las plantas Col-0, pero los niveles de expresión a tres y cuatro semanas después del alzado (cuando se produce la parada) fueron significativamente menores que en el control (Fig. C2.8A). Finalmente, la expresión de *HB21* en el mutante *ful-2* fue muy baja durante todo el desarrollo de la inflorescencia, elevándose ligeramente sólo a las seis semanas del alzado, un estadio en el que las plantas silvestres y *ap2-170* han experimentado la parada

proliferativa pero en el que el mutante *ful-2* permanece activo, aunque con una tasa baja de producción de flores (Fig. C2.8A). Los cambios en los niveles de expresión detectados por qRT-PCR fueron acordes con los análisis de GUS reportados por la línea reportera *HB21pro:GUS* (Fig. C2.1).

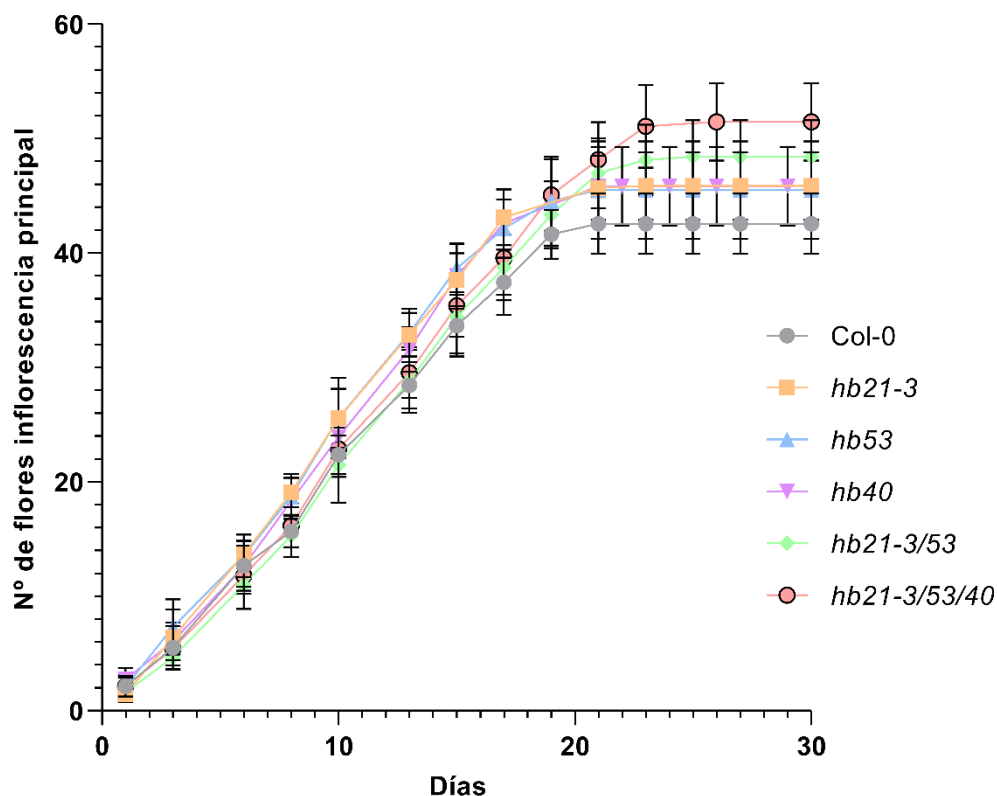


Figura C2.7. Número de flores producidas por mutantes simples y combinación de mutantes *HB21*, *HB40* y *HB53* en el tiempo. Número de flores (acumulado) producidas a lo largo del tiempo en los fondos genéticos Col-0, *hb21-3*, *hb53*, *hb40*, *hb21-3 hb53* y *hb21-3 hb40 hb53* en la inflorescencia principal.

Como se observó para la expresión de *HB21*, la expresión de *HB40* y *HB53* en las plantas Col-0 se empezó a detectar tres semanas después del alzado, alcanzando su expresión más alta en los ápices inflorescentes en parada proliferativa (Fig. C2.8B-C). La expresión de *HB40* en el mutante *ap2-170*, donde la parada del meristemo está retrasada, y en el mutante *ful-2*, donde la parada del meristemo nunca ocurre, fue baja en todos los puntos medidos, acumulándose sólo un poco en el *ap2-170* parado (cuatro semanas después del alzado) o en el ápice de plantas *ful-2* entrando en senescencia general a las 6 semanas del alzado (Fig. C2.8B). La expresión de *HB53* en el mutante *ap2-170* fue similar a la observada en las plantas Col-0, pero no aumentó su expresión al mismo nivel en el momento de la parada del meristemo (Fig. C2.8C). Los transcritos de *HB53* en el mutante *ful-2* se mantuvieron siempre a niveles bajos (Fig. C2.8C). Nuestro análisis confirma que

HB40 y *HB53* se acumulan a niveles elevados al final de la floración al igual que *HB21*, y que la regulación ejercida por AP2 y FUL sobre ellos es similar también. En conjunto, estos datos sugieren la idea de que los tres genes *HB* podrían también actuar redundantemente en el control de la parada proliferativa al final de la fase de floración.

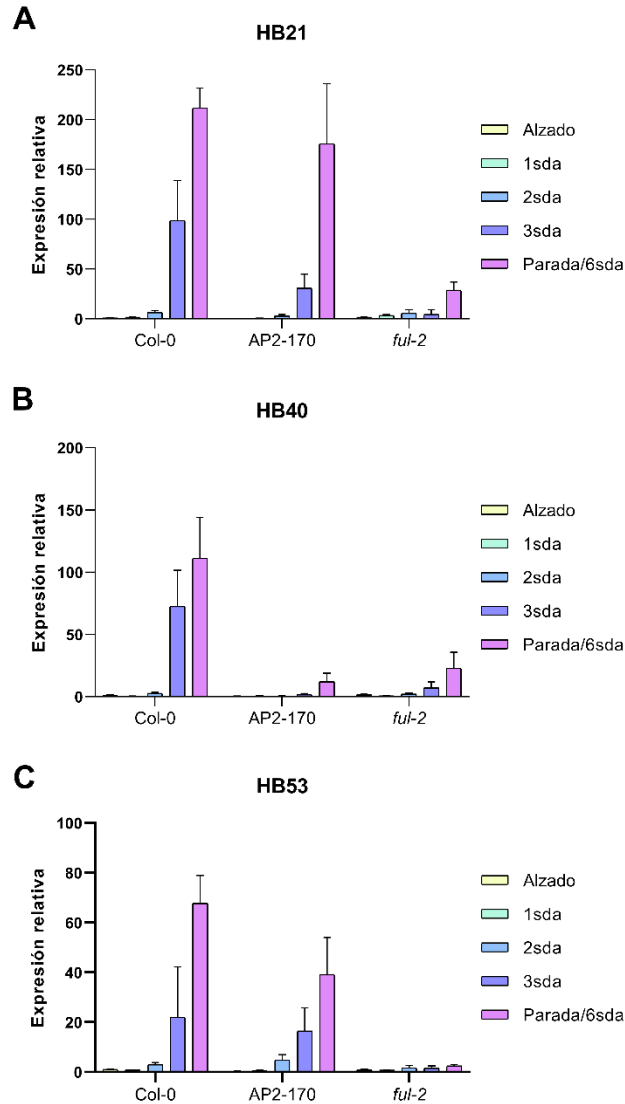


Figura C2.8. La expresión relativa de *HB21*, *HB40* y *HB53* aumenta al final de la floración en el ápice de la inflorescencia principal. Niveles transcripcionales de *HB21* (A), *HB40* (B) y *HB53* (C) en diferentes puntos de la fase reproductiva. Todos los transcritos se acumulan al final de la floración en Col-0, de una manera reducida en el mutante *ap2-170* y casi no se detectan en el mutante *ful-2*.

Para comprobar esta hipótesis, caracterizamos los mutantes simples *hb40-1* (SALK_115125C) y *hb53-1* (GK_312E06_015817) (Fig. C2.9) así como el doble mutante *hb21-3 hb53-1* y el triple mutante *hb21-3 hb40 hb53-1*. Los mutantes simples *hb40-1* y *hb53-1* produjeron de media un pequeño incremento en el número final de flores producidas ($45,83 \pm 3,46$ y $45,23 \pm 4,32$ respectivamente) con respecto a las plantas control Col-0 ($41,83 \pm 1,94$), pero sólo el efecto de *hb40* fue estadísticamente significativo (Fig.

C2.7, Fig. C2.10A). El doble mutante *hb21-3 hb53-1* produjo un incremento estadísticamente significativo en el número final de flores ($47,69 \pm 2,95$) respecto con las plantas Col-0, pero no respecto al mutante *hb21-3* (Fig. C2.7, Fig. C2.10A). Finalmente, el triple mutante *hb21-3 hb40 hb53-1* presentó el fenotipo más severo en el número de flores producidas por la inflorescencia principal con respecto a Col-0, así como con respecto al mutante simple *hb21-3*, con una producción de $49,25 \pm 3,66$ flores.

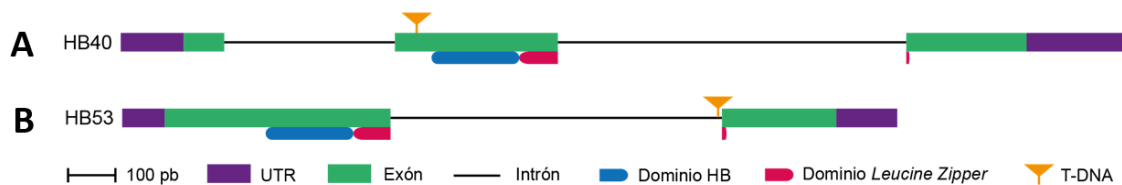


Figura C2.9. Diagrama de la localización de la inserción de T-DNA en los genes *HB40* y *HB53* según la información disponible en el TAIR. Diagrama de los genes *HB40* (A) y *HB53* (B). La región codificante se representa en verde y las regiones 5'UTR y 3'UTR en morado. En azul se indica el dominio HB, en rosa el dominio *Leucine zipper* y en naranja la localización de cada inserción de T-DNA.

Los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* se expresan principalmente al final del periodo de floración, desde el momento en que el meristemo disminuye su capacidad proliferativa hasta su parada. Así, dichos genes deberían ejercer su función en este estadio del desarrollo. De acuerdo con esto, los diferentes mutantes caracterizados no afectaron a la actividad del meristemo de un modo evidente durante las primeras semanas de la producción de flores (Fig. C2.7). Calculamos el periodo de producción de flores de la inflorescencias y no observamos diferencias entre Col-0 y todos los mutantes simples (Fig. C2.10B). En contraste, tanto el doble como el triple mutante mostraron una clara extensión del periodo de floración con respecto a las plantas Col-0. La última flor abierta en Col-0 se observó $19 \pm 1,15$ días después de la apertura de la primera flor (Fig. C2.7, Fig. C2.10B). En cambio, en el doble mutante *hb21-3 hb53-1* y el triple mutante *hb21-3 hb40 hb53-1* las últimas flores se abrieron a los $22,14 \pm 1,23$ y $23,38 \pm 0,62$ días, respectivamente (Fig. C2.7, Fig. C2.10B).

Nuestros resultados indicaron por tanto que los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* regulan el número final de flores producidas por la inflorescencia principal de forma redundante alargando el periodo de floración.

A nivel fenotípico, ninguno de los mutantes estudiados simples o en combinación (*hb21-3*, *hb40*, *hb53-1*, *hb21-3 hb53-1* y *hb21-3 hb40 hb53-1*) presentó alteraciones

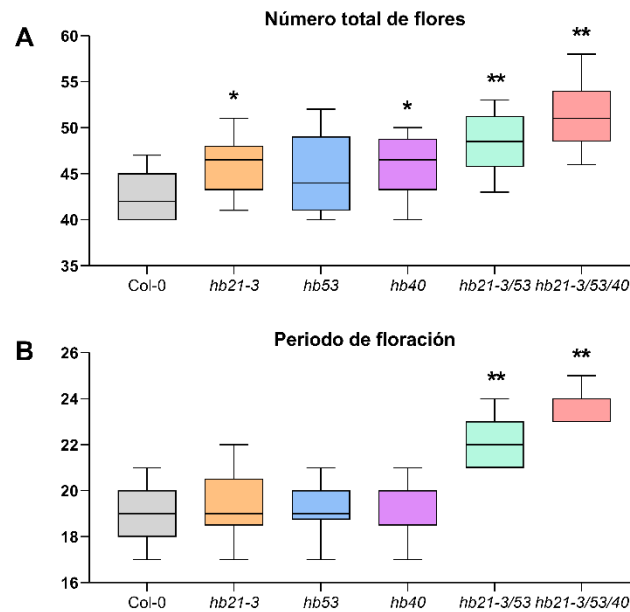


Figura C2.10. *HB21*, *HB40* y *HB53* actúan redundantemente en la parada de la actividad del meristemo. (A) Número de flores totales producidas en los fondos genéticos *Col-0*, *hb21-3*, *hb53-1*, *hb40*, *hb21-3 hb53-1* y *hb21-3 hb40 hb53-1* en la inflorescencia principal, *hb21-3* y *hb40* produjeron más flores que *Col-0*, y la combinación *hb21-3 hb53-1* y *hb21-3 hb40 hb53-1* produjo más flores que los mutantes simples. **(B)** Duración de la floración en la inflorescencia principal en los fondos genéticos *Col-0*, *hb21-3*, *hb53-1*, *hb40*, *hb21-3 hb53-1* y *hb21-3 hb40 hb53-1*, cuantificado como el intervalo entre que se observaron la primera y última flor en antesis. El asterisco señala diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,05$. El doble asterisco señala diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,01$.

evidentes en el desarrollo (**Fig. C2.11**). Las plantas mutantes a nivel general se desarrollaban igual que *Col-0* (**Fig. C2.11A-F**); los frutos mantenían su tamaño, grosor y forma (**Fig. C2.11G-R**); las inflorescencias tenían una arquitectura similar (**Fig. C2.11S-X**); flores y gineceos no presentaban ningún cambio morfológico apreciable (**Fig. C2.11Y-AJ**) y todas experimentaban la parada de la proliferación al final del ciclo reproductivo formando un grupo de yemas florales que no progresaban en el desarrollo, por debajo del cual se producía la elongación de los entrenudos y se completaba el desarrollo de los frutos producto de las últimas flores fecundadas (**Fig. C2.11AK-AP**).

Al observar en detalle el ápice de la inflorescencia principal en parada proliferativa, detectamos diferencias en el conjunto de yemas florales que no progresan en el desarrollo y quedan en el ápice agrupadas (**Fig. C2.12**). En los mutantes simples *hb21-3* y *hb53-1* no se observaron diferencias apreciables con respecto a *Col-0* (**Fig. C2.12B, C**) mientras que en mutante *hb40-1* el número de yemas florales agrupadas se redujo notablemente (**Fig.**

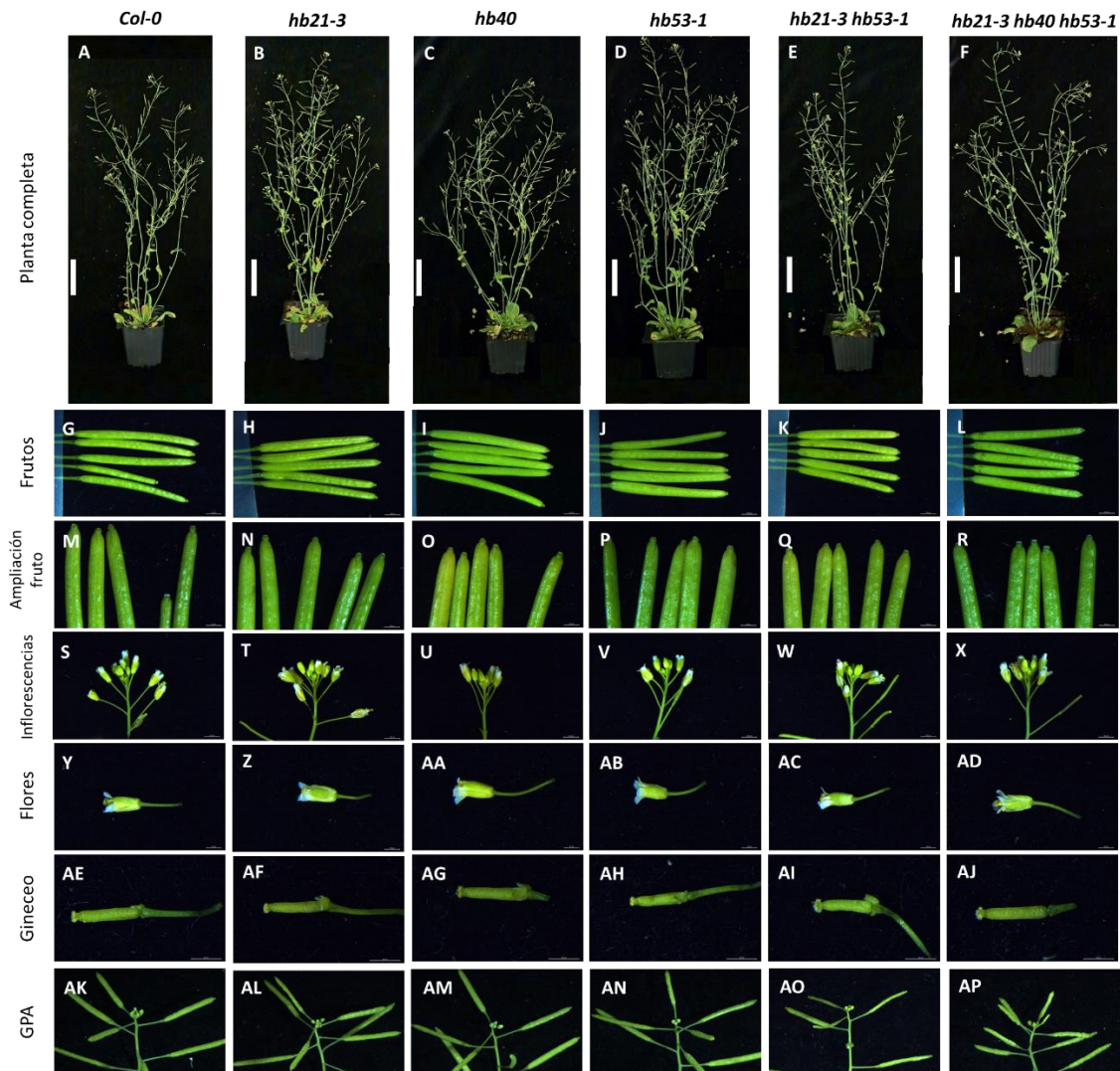


Figura C2.11. Fenotipo de las plantas Col-0, *hb21-3*, *hb40*, *hb53-1*, *hb21-3 hb53-1* y *hb21-3 hb40 hb53-1*. Fotografía de planta entera en Col-0 (A) *hb21-3* (B), *hb40* (C), *hb53-1* (D), *hb21-3 hb53-1* (E) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (F) barra 5cm. Fotografía a bajo aumento de frutos de Col-0 (G) *hb21-3* (H), *hb40* (I), *hb53-1* (J), *hb21-3 hb53-1* (K) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (L) barra 1mm. Fotografía a mayor aumento de frutos de Col-0 (M) *hb21-3* (N), *hb40* (O), *hb53-1* (P), *hb21-3 hb53-1* (Q) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (R) barra 0,5mm. Fotografía a bajo aumento de la inflorescencia en Col-0 (S) *hb21-3* (T), *hb40* (U), *hb53-1* (V), *hb21-3 hb53-1* (W) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (X) barra 1mm. Fotografía a bajo aumento de la flor en Col-0 (Y) *hb21-3* (Z), *hb40* (AA), *hb53-1* (AB), *hb21-3 hb53-1* (AC) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (AD) barra 0,5mm. Fotografía a bajo aumento del gineceo en Col-0 (AE) *hb21-3* (AF), *hb40* (AG), *hb53-1* (AH), *hb21-3 hb53-1* (AI) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (AJ) 0,5mm. Fotografía a bajo aumento del ápice inflorescente parado de Col-0 (AK) *hb21-3* (AL), *hb40* (AM), *hb53-1* (AN), *hb21-3 hb53-1* (AO) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (AP) barra 1mm.

C2.12D). Todos estos mutantes simples habían mostrado un aumento en el número de flores producidas en comparación con Col-0, siendo sólo los cambios en número de flores de *hb21-3* y *hb40-1* estadísticamente significativos (Fig. C2.7, Fig. C2.10A), por lo que llama la atención que solo la mutación simple de *HB40* genere un cambio en el grupo de yemas florales paradas de la inflorescencia principal no proliferativa. A medida que se acumulan las mutaciones, el efecto en el número de botones florales del ápice es más

evidente, siendo el número de botones florales del doble mutante *hb21-3 hb53-1* menor que el del simple mutante *hb40-1*, y el del triple mutante *hb21-3 hb40 hb53-1* menor que el de *hb21-3 hb53-1*. Esta observación sugiere que el aumento en la producción de flores podría deberse a que no se produce correctamente el bloqueo del desarrollo de los botones florales y los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* tengan un papel en la fase de la parada de la proliferación correspondiente a ese proceso (Walker et al., 2023).

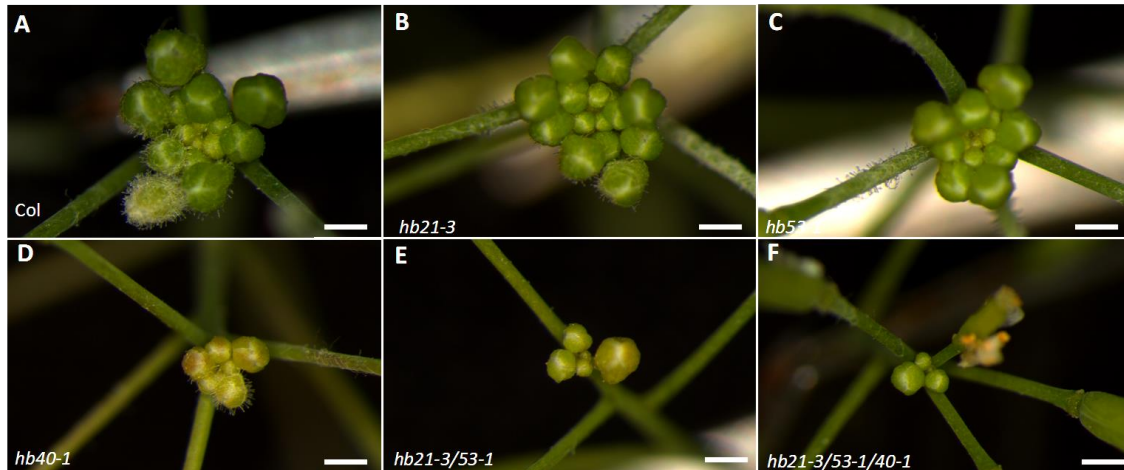


Figura C2.12. Grupo de yemas florales en la inflorescencia principal con parada proliferativa en Col-0, *hb21-3*, *hb53-1*, *hb40*, *hb21-3 hb53-1* y *hb21-3 hb40 hb53-1*. Yemas florales bloqueadas durante la parada de la proliferación en Col-0 (A), *hb21-3* (B), *hb53-1* (C), *hb40* (D), *hb21-3 hb53-1* (E) y *hb21-3 hb40 hb53-1* (F). El número de yemas se reduce conforme aumentan los genes mutados. Barra = 0,5mm

***HB21* controla la parada del meristemo controlando la respuesta a ABA**

Nuestros resultados indican que los genes *HB* participan en el control del final de la floración. Para obtener más datos acerca de su mecanismo de acción y, en concreto, de las redes regulatorias actuando aguas abajo de estos factores en el control del final de la floración, decidimos realizar un análisis transcriptómico completo. La línea inducible de *HB21* nos permite superar la redundancia con *HB40* y *HB53*, así que decidimos usar esta herramienta para este estudio. Tratamos ápices inflorescentes de la línea *HB21*ind #7 (de efecto fenotípico fuerte) dos semanas después del alzado (meristemos activos con bajos niveles endógenos de expresión de *HB21*) con Dexa o *mock*. Después, 6 horas tras el tratamiento, colectamos los ápices inflorescentes, eliminando todos los botones florales visibles. Para la secuenciación del RNA se utilizaron tres réplicas biológicas para cada tratamiento. Transcritos con una proporción de cambio de lecturas (*log2 fold change*, FC) >1 y <-1, con un p-valor ajustado <0,05 fueron considerados como genes diferencialmente expresados (DEG) y seleccionados para análisis posteriores. Obtuvimos 1143 DEGs, 471 activados y 672 reprimidos por la inducción de *HB21*.

Con esta lista de genes diferencialmente expresados, realizamos un análisis de Ontología Génica (GO, del inglés *Gene Ontology*) usando la herramienta BiNGO (Maere et al., 2005) implementado por Cytoscape (Shannon et al., 2003), enfocándonos en los términos enriquecidos en la categoría Proceso Biológico. Para los DEGs reprimidos, encontramos 69 categorías sobrerrepresentadas, incluyendo la respuesta a múltiples estímulos y a estrés (**Anexo VI**). Dentro de la categoría de “respuesta a múltiples estímulos” destacaba la respuesta a hormonas como el ácido jasmónico (12 genes), ácido salicílico (11 genes), ácido abscísico (16 genes), auxinas (15 genes) y etileno (9 genes) (**Fig. C2.13A**). La categoría de “respuesta a estrés” incluía la respuesta a hipoxia (4 genes), a privación del agua (14 genes), calor (14 genes), frío (19 genes) y respuesta a estrés oxidativo (16 genes) (**Fig. C2.13A**). Para los DEGs inducidos encontramos 53 categorías sobrerrepresentadas que incluían categorías similares a las observadas en el grupo reprimido (**Anexo VI**), destacando la respuesta a ácido abscísico (25 genes), privación de agua (31 genes) y frío (21 genes) (**Fig. C2.13B**). Además, la respuesta a luz (17 genes) también estaba sobrerrepresentada, así como las categorías de senescencia de hojas y órganos (4 genes) (**Fig. C2.13B**). Este análisis indicaba que la inducción de *HB21* es capaz de modular múltiples respuestas, tanto endógenas como exógenas. Se ha descrito que la parada del meristemo al final de la floración está asociada a un incremento en la respuesta a ABA y que se parece al estado de dormancia de los meristemos axilares. El factor de transcripción AP2 reprime la parada de la proliferación, al menos en parte, por la represión de la respuesta a ABA. Como AP2 es un regulador negativo directo de *HB21*, decidimos analizar qué parte del papel de AP2 en la parada de la proliferación está mediada por *HB21*. Así, comparamos los DEGs que responden a la inducción de AP2 (Martínez-Fernández et al., 2020) con los DEGs que responden a la inducción de *HB21*. AP2 y *HB21* provocan efectos opuestos en la parada del meristemo: AP2 promueve la actividad del meristemo mientras *HB21* promueve la parada del meristemo y senescencia. Por ello, nos enfocamos en genes que mostraron un comportamiento contrario en ambos experimentos. Encontramos que un total de 116 genes mostraron este patrón, 81 fueron inducidos por *HB21* y reprimidos por AP2 y 35 fueron reprimidos por *HB21* e inducidos por AP2 (**Fig. C2.13C**). Realizamos un nuevo análisis GO con estos subconjuntos de genes (**Anexo VII**) y encontramos que en el grupo de genes inducidos por *HB21* y reprimidos por AP2 también estaban enriquecidas las categorías de respuesta a estrés, incluyendo la respuesta a frío (8 genes), la respuesta a privación de agua (13 genes), y la respuesta a estímulos endógenos, destacando la respuesta a ácido abscísico (8 genes) (**Fig. C2.13D**). En el grupo

complementario, sólo las categorías de proceso metabólico de sulfuro (4 genes) y asimilación de sulfato (3 genes) destacaron.

Nuestro análisis sugería que *HB21* podría mediar la respuesta a ABA que aparecía reprimida por *AP2*. Una vez *HB21* se acumula en los ápices inflorescentes podría activar la respuesta a ABA. De acuerdo con esta hipótesis identificamos en la lista de DEGs inducidos dos genes clave en la ruta biosintética del ABA, *NCED3* y *NCED4* (Iuchi et al., 2001; Tan et al., 2003), con cambio de valores en el log₂FC de 4,35 y 1,77, respectivamente. Por ello, hipotetizamos que la inducción de *HB21* induce la biosíntesis de ABA y la subsecuente respuesta a ABA que podría mediar la parada de flores y meristemos.

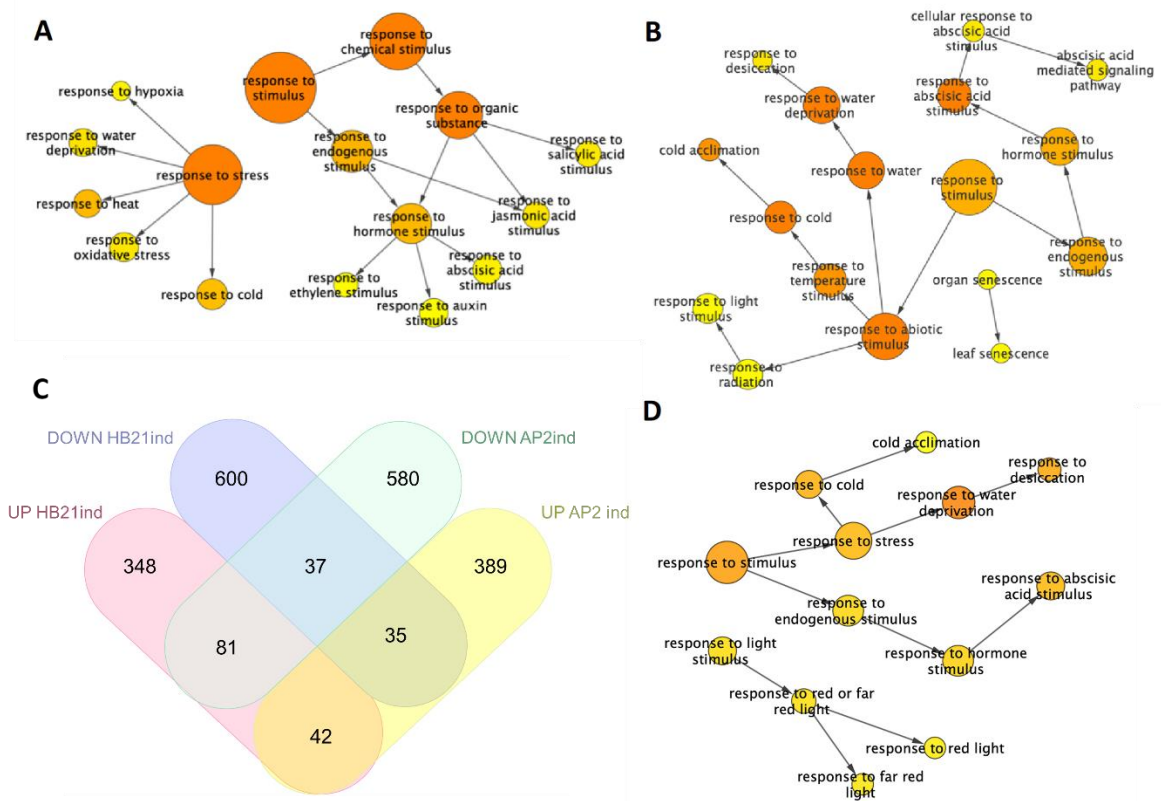


Figura C2.13. Análisis de enriquecimiento funcional con las categorías GO sobrerrepresentadas correspondientes a proceso biológico. El análisis fue realizado para los DEGs totales reprimidos (A) y inducidos (B) por la inducción de *HB21*. El diagrama de Venn muestra DEGs compartidos entre la inducción de *HB21* y la inducción de *AP2* (C). Análisis GO de los 81 DEGs inducidos por *HB21* y reprimidos por *AP2* (D). Todos los análisis comparten la respuesta a frío, privación de agua y respuesta a ácido abscísico (A, B, D). El tamaño del círculo es proporcional al número de genes, y el color de cada círculo representa el p-valor de enriquecimiento (test hipergeométrico) para el término GO que titula ese círculo, con naranja representando el mayor enriquecimiento y amarillo el menor sobre el punto de corte (p-value<0,05). Algunas categorías se han eliminado y la distancia entre los nodos se ha modificado para optimizar la lectura. La figura y su análisis estadístico se generaron usando el *software* BiNGO.

Para probar esta hipótesis, en primer lugar, decidimos comprobar si efectivamente la inducción de *HB21* aumentaba los niveles de ABA en el meristemo inflorescente. Para ello, realizamos una cuantificación de la concentración de esta hormona en 8 meristemos apicales a las 6 horas y las 24 horas tras la realización de tratamientos con Dexta y *mock*. Los resultados mostraron que seis horas después de la aplicación del tratamiento con Dexta los niveles de ABA se triplicaban a comparación del tratamiento control. Este resultado se mantuvo a las 24 horas del tratamiento. Estos resultados reforzaron nuestra hipótesis de que efectivamente *HB21* es capaz de inducir la producción de ABA cuando se expresa en el meristemo apical.

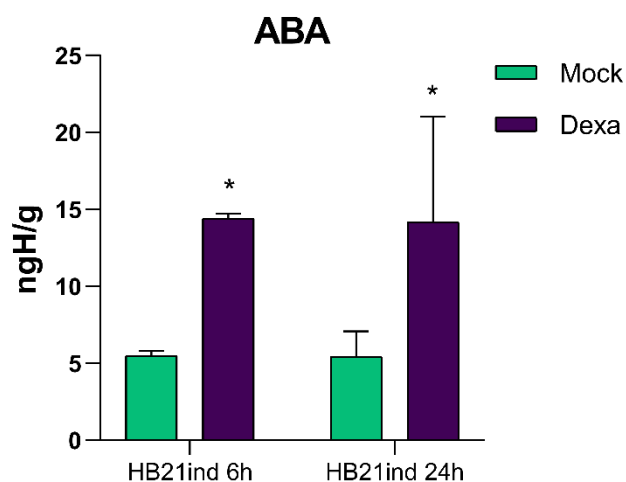


Figura C2.14. *HB21* induce la producción de ácido abscísico. La inducción de *HB21* en meristemos apicales con Dexta triplica la producción de ABA en el meristemo apical a las 6 horas a comparación del control *mock*, valores que se mantienen a las 24 horas del tratamiento. El asterisco señala diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,05$.

Seguidamente, decidimos aplicar tratamientos locales de ABA en ápices inflorescentes y evaluar su impacto en la parada de la actividad meristemática de plantas Col-0 así como los mutantes *hb21-3 hb40 hb53-1, ap2-170* y *ful-2*. Aplicamos una gota de solución ABA 70 μ M en ápices inflorescentes durante tres días consecutivos. El tratamiento de ABA afectó de manera idéntica a todos los genotipos probados. Mientras que las plantas control (tratadas con *mock*) continuaron con un crecimiento inflorescente normal (**Fig. C2.15A,C,E,G**), las plantas tratadas con ABA mostraron una clara reducción del crecimiento. El ABA produjo en el ápice de la inflorescencia un efecto similar al observado al final de la floración, con una reducción de la elongación del tallo y el bloqueo del desarrollo de las flores ya formadas (**Fig. C2.15B,D,F,H**). Curiosamente, todas las plantas retomaban el crecimiento de la inflorescencia cuando se interrumpía el tratamiento,

sugiriendo que los niveles altos de ABA son necesarios para parar la progresión del desarrollo de la inflorescencia.

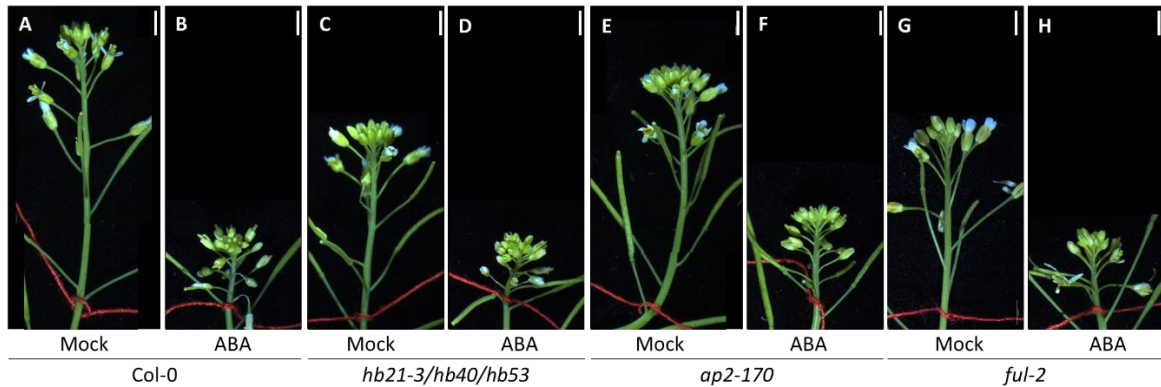


Figura C2.15. El ácido abscísico detiene el desarrollo del ápice inflorescente principal. La inducción de ABA se realizó en los fondos genéticos Col-0, *hb21-3 hb40 hb53-1*, *ap2-170* y *ful-2*. (A) Inflorescencia apical Col-0 tratada con mock control y (B) tras el tratamiento con ABA. (C) Inflorescencia apical *hb21-3 hb40 hb53-1* tratada con mock control y (D) tras el tratamiento con ABA. (E) Inflorescencia apical *ap2-170* tratada con mock control y (F) tras el tratamiento con ABA. (G) Inflorescencia apical *ful-2* tratada con mock control y (H) tras el tratamiento con ABA. Una disminución en el crecimiento se observó en todos los genotipos tras la aplicación de ABA. Barra = 2,5mm.

Por último, decidimos analizar individualmente el comportamiento de una serie de genes relacionados con este trabajo (los genes *SPL*), así como otros relacionados con el mantenimiento del meristemo y la ruta FUL-AP2 (Tabla C2.1) en nuestros datos de RNAseq.

Pudimos comprobar que la mayoría de los genes relacionados con la ruta FUL/AP2 o con el mantenimiento del meristemo no se veían afectados por la inducción de *HB21*, lo que reforzó la idea de que *HB21* es un gen efector, que actuaría aguas abajo de las rutas que controlan el final de la floración. Llamó la atención la sobreexpresión de *TFL1* y *CLV1*, relacionados con la represión de formación de flores y la represión de formación de células madre en el meristemo, respectivamente (Alvarez et al., 1992; Clark et al., 1997; Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Willmann, 2000). Es posible que estos genes en principio independientes de la respuesta a ABA estén relacionados también con el fenotipo observado tras la inducción de *HB21* de parada de formación de flores y de actividad meristemática.

Tabla C2.1. Log2FC, padj y tpms de genes de interés relacionados con los genes *HB21* *HB40* y *HB53*.

Comp. Genotipos		<i>HB21ind</i> Dexa vs Mock		Media tpms	
ID	Gen	log2FC	padj	HB21 Dexa	HB21 Mock
SPL1	AT2G47070	0,12	0,26	96,39	91,71
SPL12	AT3G60030	0,19	0,12	33,90	30,70
SPL14	AT1G20980	-0,04	0,79	81,80	86,58
SPL16	AT1G76580	0,13	0,55	29,91	28,17
NCED3	AT3G14440	4,35	0,00	54,63	2,78
FUL	AT5G60910	-0,48	0,01	56,95	81,75
AP2	AT4G36920	-0,07	0,69	56,45	60,97
SNZ	AT2G39250	-	-	0,13	0,00
SMZ	AT3G54990	-	-	0,67	0,52
TFL1	AT5G03840	2,02	0,00	35,60	9,01
FT	AT1G65480	-	-	0,65	1,03
WUS	AT2G17950	-0,11	0,79	6,94	7,72
FLC	AT5G10140	-	-	0,06	0,08
FD	AT4G35900	-0,56	0,02	11,79	17,92
LFY	AT5G61850	0,53	0,00	52,42	37,46
SOC1	AT2G45660	-0,32	0,19	50,27	64,58
GI	AT1G22770	0,52	0,00	74,81	54,12
SEP3	AT1G24260	0,03	0,83	199,74	201,89
AP1	AT1G69120	-0,18	0,41	147,80	171,85
KNU	AT5G14010	0,22	0,61	8,34	7,40
CLV1	AT1G75820	0,43	0,00	21,25	16,27
CLV2	AT1G65380	0,15	0,42	15,08	14,01
CLV3	AT2G27250	-	-	0,30	0,26
SVP	AT2G22540	-0,27	0,21	12,51	15,57
KMD1	AT1G80440	-0,54	0,25	5,37	8,06
BRC1	AT3G18550	-	-	0,00	0,05

*En rojo valores de padj no significativos, en celda roja genes reprimidos estadísticamente significativos, en celda verde genes sobreexpresados estadísticamente significativos.

Discusión

Durante los últimos años, los mecanismos que controlan el proceso de desarrollo del final de la floración en plantas monocárpicas han empezado a dilucidarse. Se ha demostrado que la parada del meristemo asociada con el final de la floración está bajo control genético, siendo el factor de transcripción AP2 un regulador clave (Balanzà et al., 2018; Martínez-Fernández et al., 2020). La parada del meristemo está afectada por

factores ambientales como la calidad de la luz, fotoperiodo o temperatura (González-Suarez et al., 2023; Martínez-Fernández et al., 2020) así como por factores endógenos como la edad, y hormonas como las auxinas y citoquininas (Goertz et al., 2021; Martínez-Fernández et al., 2020; Merelo et al., 2022; Walker et al., 2023; Ware et al., 2020). Además, análisis transcriptómicos han sugerido también que la señalización de ABA podría mediar la parada del meristemo (Martínez-Fernández et al., 2020; Wuest et al., 2016). Este trabajo indica que *HB21*, una diana directa de *AP2*, en conjunto con *HB40* y *HB53*, puede promover la respuesta a ABA asociada con el final de la floración.

HB21, *HB40* y *HB53* han sido descritos como parte de la red genética reguladora que controla la dormancia de botones laterales en *Arabidopsis*. Los tres genes son activados por el gen TCP *BRANCHED1* (*BRC1*) en meristemos axilares. Hemos mostrado que *HB21*, *HB40* y *HB53* se expresan en el ápice inflorescente cuando se inicia la disminución de la tasa proliferativa del meristemo, al mismo tiempo que el gen de mantenimiento del meristemo *WUS* comienza su declive. Por lo tanto, *HB21*, *HB40* y *HB53*, al igual que hacen en los meristemos axilares, podrían ejercer una función similar en el ápice inflorescente, activando la biosíntesis de ABA y su respuesta. Se ha descrito que, en un punto similar al de la activación de la expresión de *HB21*, *HB40* y *HB53* en el ápice, la respuesta a citoquininas empieza a disminuir (Merelo et al., 2022). Las citoquininas son esenciales para el mantenimiento del meristemo, promover la división celular y la expresión de *WUS* (Bartrina et al., 2011; Bartrina et al., 2017; Meng et al., 2017; Merelo et al., 2022; Schaller et al., 2014). Por otra parte, altos niveles de ABA, restringen el crecimiento y promueven la dormancia (González-Grandío et al., 2017; Reddy et al., 2013; Sreenivasulu et al., 2012; Yao and Finlayson, 2015). Por lo tanto, podemos hipotetizar que en el ápice inflorescente, cuando los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* empiezan a expresarse, causan la inducción de los genes *NCED* y la consecuente acumulación de ABA. Se ha propuesto que niveles elevados de ABA, como los inducidos por sequía, podrían inhibir la biosíntesis de citoquininas (Abe et al., 1997; Vaseva et al., 2008). De este modo, la respuesta a ABA activada por la inducción de *HB21* podría participar en la represión progresiva de la respuesta a citoquininas observada en el final de la floración. Al mismo tiempo, niveles bajos de citoquininas pueden causar hipersensibilidad al ABA (Nishiyama et al., 2011). Así, el ABA podría ser un determinante importante en el control del meristemo apical. Apoyando esta hipótesis, en condiciones de sequía, donde los niveles de ABA son elevados, se ha descrito una parada de la inflorescencia temprana y transitoria (Su et al., 2013). También hemos confirmado que un tratamiento local de ABA en las inflorescencias es capaz de parar las inflorescencias jóvenes de distintos fondos genéticos afectados en el control de la

parada de la floración, sugiriendo que ABA es un efector final en la inducción de la parada de la inflorescencia.

Esta observación también explica los efectos menos severos de nuestra línea inducible HB21 en el fondo *ap2-170*, donde la respuesta a citoquininas debería ser alta debido a la represión de los genes *KMD* (Kim et al., 2013; Martínez-Fernández et al., 2020). Curiosamente, la inducción de *HB21* en el mutante *ful* no produjo ningún efecto en la capacidad proliferativa de la inflorescencia, a pesar de que el tratamiento con ABA fue capaz de parar la inflorescencia *ful*. Esto sugiere una clara dependencia del efecto de *HB21* con la presencia de una proteína *FUL* funcional. Ambos genes, *HB21* y *FUL*, son promotores de la parada del meristemo, pero la expresión de *HB21* depende de *FUL*. Una vez *HB21* está presente, requiere de un gen *FUL* funcional para afectar al comportamiento del meristemo. Podría ser interesante evaluar si las dos proteínas son capaces de interactuar, o si *HB21* requiere de un factor adicional que dependa de *FUL*.

A nivel macroscópico, el final de la floración está caracterizado por tres eventos diferentes: ausencia de elongación del tallo, bloqueo del desarrollo de primordios florales y parada del meristemo. Tras la inducción de *HB21* en un ápice inflorescente joven, estos tres eventos son observables, sugiriendo que *HB21* es suficiente para activar el proceso del final de la floración. En la línea inducible suave, el fenotipo principal observado fue el bloqueo del desarrollo de primordios florales, cuando en la línea fuerte estaban afectadas tanto la elongación del tallo como la proliferación del meristemo, además del bloqueo del desarrollo de los primordios florales. Estos resultados sugieren que la acumulación de *HB21* es capaz de activar los tres eventos descritos, pero que los niveles de *HB21* requeridos para cada uno de ellos podría ser diferente, siendo el bloqueo del desarrollo de flores el que requiera niveles más bajos. Hemos mostrado que en plantas Col-0, *HB21* se expresa especialmente en los primordios florales. Entonces, proponemos que *HB21* debería estar actuando inicialmente en estos tejidos, induciendo la síntesis de ABA y su respuesta, dirigiendo el bloqueo del desarrollo de los primordios florales. De hecho, en las plantas que poseían combinaciones de mutaciones como *hb21-3 hb53-1* o *hb21-3 hb40 hb53-1*, pudimos observar que el número de primordios florales detenidos al terminar la floración era aparentemente menor a del control silvestre (**Fig. C2.12**), sugiriendo, como se ha comentado previamente, que en estos mutantes no se produce correctamente el bloqueo del desarrollo de estos tejidos y los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* puedan tener un papel en la fase de la parada de la proliferación correspondiente a ese proceso (Walker et al., 2023).

Una vez los niveles de *HB21* son suficientemente altos en estos tejidos, podría contribuir también a la parada del meristemo de manera no autónoma celular, bien por la activación de un segundo factor o bien por el transporte del propio ABA a los tejidos adyacentes del meristemo (Kuromori et al., 2010). De cualquier forma, no podemos descartar que *HB21* pueda estar actuando directamente en el meristemo, ya que el transcrito de este gen ha sido detectado a niveles altos mediante RNA-seq en muestras micro-diseccionadas del meristemo apical del tallo en el momento de la parada (Wuest et al., 2016). Estas observaciones están de acuerdo con la reciente propuesta de la progresión en la parada de la inflorescencia como dos procesos independientes y separados, por una parte, el bloqueo en el desarrollo de las flores y, por otra parte, la parada del meristemo apical del tallo (Walker et al., 2023).

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned in the lower right quadrant of the page. The text 'DISCUSIÓN GENERAL' is centered over this splash.

DISCUSIÓN GENERAL

Una de las conclusiones que se puede obtener del trabajo realizado en esta tesis es que la señalización mediada por ABA sería un nuevo elemento regulador clave de la parada proliferativa del meristemo inflorescente. En el Capítulo 1 de esta tesis se muestra como la ausencia de los genes *SPL* con dominio de anquirina estudiados adelantan la parada proliferativa, observándose un enriquecimiento en genes involucrados en la respuesta a abscísico. La posible relación entre estos genes *SPL-ANQ* y ABA ya se había descrito previamente en tejido floral, donde estos genes actuarían como promotores de la respuesta a ABA (Chao et al., 2017). En este trabajo, sin embargo, observamos que los genes de respuesta a abscísico se encuentran inducidos en meristemos al mutar los genes *SPL-ANQ*, sugiriendo que la función de estos genes como activadores o represores depende del tejido donde se expresen o de la etapa del desarrollo en la que actúan. En el Capítulo 2, nuestro trabajo indicó que los genes *HB21*, *HB40*, *HB53* también median su efecto sobre la parada proliferativa del meristemo inflorescente a través de la respuesta a ácido abscísico, posiblemente mediante la activación del gen *NCED3*, como previamente se ha mostrado en la dormancia de los meristemos axilares (González-Grandío, 2017). Los resultados obtenidos refuerzan la hipótesis propuesta por Martínez-Fernández et al. en 2020, donde se sugería que la señalización por ABA podría estar actuando aguas abajo de la ruta FUL-AP2.

El análisis realizado en este trabajo ubicaría a los genes *SPL-ANQ* aguas arriba de la ruta FUL-AP2, mientras que los genes *HB* estarían ubicados aguas abajo de esta ruta. De acuerdo con esta jerarquía, en los datos de RNA-seq obtenidos con la línea inducible de *HB21* no se vieron afectados los niveles de expresión de los genes que en nuestro modelo actúan por arriba de los *HB* (*SPL*, *FUL*, *AP2*; **Tabla C.2.1**). Al contrario, al analizar los datos de RNA-seq realizado con el *spl-quad*, observamos que se desregulaban los genes que actúan aguas abajo en nuestro modelo, incluyendo también a los genes *HB*. Tanto *HB21* como *HB40* se encontraban inducidos en *spl-quad* de manera significativa (Log₂FC de 1,16 y 1,29 respectivamente, **Tabla C.1.2**). *HB53* también mostraba un log₂FC positivo, aunque no era estadísticamente significativo. Cabe destacar que tanto *SPL1* como *SPL14* son capaces de unirse a las regiones promotoras de los tres genes *HB* estudiados en ensayos de DAP-seq (<http://bar.utoronto.ca/eplant/>, O'Malley et al., 2016). Estos datos sugerirían que los factores *SPL-ANQ* podrían regular a los genes *HB* tanto de forma indirecta, a través de la ruta FUL-AP2, como de forma directa.

Como hemos comentado anteriormente, los genes *SPL-ANQ* parecen mostrar un comportamiento dual, actuando como represores o activadores en función del tejido o

etapa del desarrollo en el que actúan. En nuestros experimentos las proteínas SPL-ANQ parecen actuar como represores, por lo que podríamos esperar que actuaran también como represores de los genes *HB*. De ser así, los genes *SPL* podrían modular la respuesta a ABA de forma dependiente e independiente de la ruta FUL-AP2. Así, podemos ampliar el esquema de ruta propuesta para la función de los genes *SPL* con dominio de anquirina en la parada de la proliferación en el Capítulo 1 con los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* como posibles intermediarios en la regulación de la respuesta a ABA producida por la mutación de los genes *SPL-ANQ*, ya sea de forma directa o indirecta (**Fig. D.1**).

Por otra parte, continuando con la hipótesis del posible papel de *FT* en la parada de la proliferación, se ha descrito que *FT* puede interactuar con *BRC1* para reprimir la transición floral en los meristemos axilares de *Arabidopsis* (Niwa et al., 2013). *BRC1* a su vez es un activador de *HB21*, *HB40* y *HB53* y por consecuencia, de la respuesta a ABA en los meristemos axilares, y por tanto responsable de la dormancia de estos meristemos (González-Grandío et al., 2016). Además, ya se ha demostrado anteriormente que la expresión ectópica de *FT* aumenta la dormancia en semillas (Chen et al., 2021). Existe la posibilidad entonces, de que el aumento de *HB21* y *HB40* en el *spl-quad* se deba al aumento en la expresión de *FT* y el presumible aumento de proteína *FT* que interactúe en mayor medida con *BRC1* aumentando los niveles de expresión de los genes *HB* y promoviendo la respuesta a ABA, sugiriendo que los genes *SPL* podrían actuar como reguladores de la ruta del ABA independientemente de *AP2* en el modelo propuesto (**Fig. D.1**).

Esta tesis resalta la importancia que tiene el ácido abscísico en la parada de la proliferación, proponiéndolo como uno de los efectores finales de la ruta que controla la parada proliferativa.

Meristemo cercano a la parada:

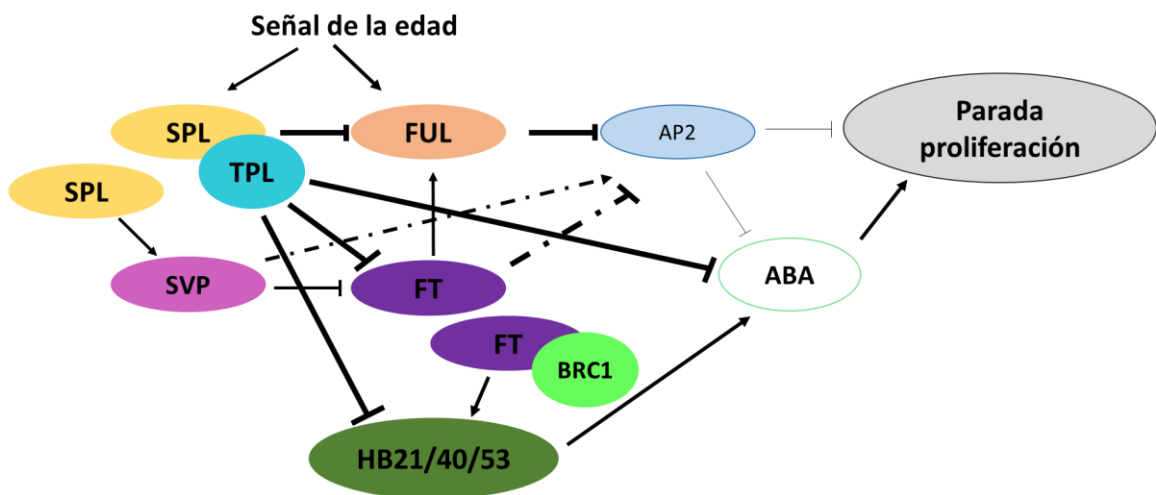


Figura D.1. Modelo integración de la ruta de *SPL-ANQ* y *HB21*, *HB40* y *HB53* en el meristemo apical inflorescente. Los genes *SPL-ANQ* podrían estar regulando negativamente la parada proliferativa a través de la inducción de *SVP*, la represión de *FT* y/o la represión de *FUL*. Además, podrían estar regulándola a través del ácido abscísico a través de la represión, directa o indirecta, de los genes *HB21/40/53*, responsables de la activación de genes de respuesta a abscísico. Una posibilidad de regulación indirecta es a través de *FT* y su interacción con *BRC1*.

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned behind the text.

CONCLUSIONES

Del trabajo realizado en esta tesis doctoral podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Los genes *SPL* con dominio de anquirina (*SPL-ANQ*) son reguladores de la parada de la floración en *Arabidopsis*, probablemente actuando a través de la regulación negativa de *FUL* y *FT* y positiva de *SVP*, ya sea de forma directa o indirecta.
2. Los factores *SPL-ANQ* actúan como activadores o represores transcripcionales según el contexto biológico.
3. Los genes *HB21*, *HB40* y *HB53* actúan de forma redundante regulando la parada de la floración, controlando tanto la parada del desarrollo de primordios florales ya formados como la actividad del meristemo inflorescente, aunque su papel parece ser preponderante en el primero de estos dos procesos.
4. La señalización por ácido abscísico tiene un papel relevante en la parada proliferativa del meristemo inflorescente. Los factores *SPL-ANQ*, *AP2-like* y *HB21*, *HB40* y *HB53* contribuyen a modular estas rutas de señalización por *ABA* en la inflorescencia a final de la fase reproductiva.

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned in the lower right quadrant of the page. The text 'MATERIAL Y MÉTODOS' is centered over this splash.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de cultivo

Cepas bacterianas utilizadas

En el desarrollo de esta tesis doctoral se han utilizado las cepas bacterianas que aparecen en la **Tabla M.1**.

Tabla M.1. Cepas bacterianas utilizadas en esta tesis.

Cepa	Uso	Origen/Referencia
Escherichia coli Supercharge EZ10	Clonaje de vectores	Clontech
Escherichia coli DB3,1TM	Clonaje de vectores portadores del gen ccdB del sistema Gateway	Invitrogen
Agrobacterium tumefaciens C58 pMP90	Transformación de Arabidopsis	(Koncz and Schell, 1986)

Material vegetal

A lo largo del trabajo se han utilizado dos ecotipos silvestres de *Arabidopsis thaliana*: Columbia-0 (Col) y Landsberg *erecta*(Ler). Se ha trabajado tanto con líneas mutantes como líneas transgénicas (**Tabla M.2**).

Condiciones de cultivo y conservación de plantas

Cultivo de plantas en invernadero

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* se sembraron en alveolos de 6,5x6,5x5cm o macetas de 12 cm de diámetro, con una mezcla 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita y se estratificaron durante 4 días en oscuridad a 4°C para sincronizar la germinación tras lo cual se pasaron a la cabina de cultivo. Las plantas se regaron con solución Hoagland nº1 suplementada con oligoelementos.

Las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero de día largo con 16h de luz y 8 de oscuridad, o en fitotrones de día corto de 8hs de luz y 16hs de oscuridad. En ambos casos la temperatura se mantuvo entre 21 y 23 °C.

Cultivo de Arabidopsis in vitro

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

Tabla M.2. Genotipos y líneas transgénicas de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo.

Linea	Ecotipo	Referencia
Líneas mutantes		
<i>spl1-101</i>	Col-0	Este trabajo
<i>spl12-101</i>	Col-0	Este trabajo
<i>spl14-101</i>	Col-0	Tesis Patricia Ballester, 2016
<i>spl16-101</i>	Col-0	Tesis Patricia Ballester, 2016
<i>otu1-1</i>	Col-0	Zang et al., 2020
<i>otu1-2</i>	Col-0	Este trabajo
<i>ful-2</i>	Col-0	Ferrándiz et al., 2000a
<i>hb21-1</i>	Col-0	González-Grandío et al., 2016
<i>hb21-2</i>	Col-0	Martínez-Fernández et al., 2020
<i>hb40</i>	Col-0	González-Grandío et al., 2016
<i>hb53</i>	Col-0	González-Grandío et al., 2016
<i>ap2-170</i>	Ler	Balanzà et al., 2018
<i>hb21-3</i>	Col-0	Este trabajo
<i>ful-cr</i>	Col-0	Este trabajo
<i>nced3-2</i>	Col-0	González-Grandío et al., 2016
Líneas transgénicas		
<i>SPL1pro::GUS</i>	Col-0	Este trabajo
<i>SPL16pro::GUS</i>	Col-0	Este trabajo
<i>SPL1pro::SPL16-YFP</i>	Col-0	Este trabajo
<i>35S::SPL14</i>	Col-0	Tesis Patricia Ballester, 2016
<i>FULpro::GUS</i>	Col-0	Ferrándiz et al., 2000a
<i>HB21pro::GUS</i>	Col-0	González-Grandío et al., 2016
<i>pOpON2.1::HB21ind</i>	Col-0	Este trabajo
<i>WUSpro::eGFP::WUS</i>	Ler	Yadav et al., 2011
Combinaciones		
<i>spl12 spl14 spl16</i>	Col-0	Este trabajo
<i>spl1 spl12 spl14 spl16 (spl-quad)</i>	Col-0	Este trabajo
<i>spl1 spl12 spl14 spl16 ful-cr</i>	Col-0	Este trabajo
<i>hb21-3 hb53</i>	Col-0	Este trabajo
<i>hb21-3 hb40 hb53</i>	Col-0	Este trabajo
<i>ap2-170 HB21pro::GUS</i>	Col-0	Este trabajo
<i>ful-2 HB21pro::GUS</i>	Col-0	Este trabajo
<i>WUSpro::eGFP::WUS</i>	Ler x Col-0	Este trabajo
<i>ap2-170 HB21ind</i>	Col-0	Este trabajo
<i>ful-2 HB21ind</i>	Col-0	Este trabajo

Se utilizó el medio MS (2.2g/L de sales MS de “Duchefa”, 20g/L de sacarosa, 0.1g/L MES y 6g/L de agar, pH 5.9) con el agente de selección correspondiente en cada caso, siendo los más comunes timentina (300 µg/L), kanamicina (50 µg/L), higromicina (20ug/L) o glufosinato de amonio (15 µg/mL), también conocido como Basta (Bayer CropScience).

Las placas con las semillas se estratificaron durante 4 días a 4 °C en oscuridad y se pasaron a cámara de cultivo in vitro con temperatura constante de 24 °C y fotoperiodo de día largo (16hs luz y 8hs de oscuridad).

Fertilización cruzada.

Para realizar cruzamientos entre los diferentes genotipos de *Arabidopsis* se emascularon las flores receptoras, con ayuda de unas pinzas cuando fue necesario, retirando todos los órganos excepto el pistilo, sobre el que se depositó el polen de las plantas donantes. Se esperó a que la silicua o la vaina se desarrollara y se secase por completo antes de recoger las semillas.

Conservación de las semillas

Las semillas se recogieron cuando las plantas terminaron su ciclo vital y se secaron al menos 7 días a 37°C. A continuación, se almacenaron en oscuridad en una cámara con una temperatura de 10°C y una humedad del 25% aproximadamente.

Condiciones de cultivo y conservación de microorganismos.

Condiciones de cultivo bacteriano.

Los cultivos líquidos de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) se incubaron toda la noche a 37°C o 28 °C respectivamente con agitación de 200rpm. Los cultivos en medio sólido se incubaron a 37°C toda la noche en el caso de *E. coli* o a 28 °C durante dos días para *A. tumefaciens*.

Los cultivos se crecieron en medio LB (Luria-Bertani médium, 1g/L tripona, 5g/L extracto de levadura, 1 g/L NaCl, pH7, medio sólido con 1,5g/l agar).

Los antibióticos utilizados como método de selección se detallan en la **Tabla M.3**.

Tabla M.3. Antibióticos y concentraciones utilizadas en medios bacterianos.

Antibiótico	Concentración (ug/ml)	Bacteria
Kanamicina	50	<i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>
Espectinomomicina	100	<i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>
Rifampicina	50	<i>A. tumefaciens</i>
Cloranfenicol	25	<i>E. coli</i>

Conservación de los microorganismos.

Las bacterias se cultivaron según el apartado anterior y se guardaron glicerizadas según Sambrook et al. (1989) con modificaciones. Los glicerizados se prepararon en tubos estériles de 2mL "Cryovial" de "Simport" (www.simport.com) con 900µl de cultivo bacteriano y 700µL de Glicerol al 60%. Se mezclaron ambas soluciones y se congelaron en nitrógeno líquido y guardaron a -80°C.

Métodos de biología molecular

Extracción y purificación de ácidos nucleicos:

Extracción de ácidos DNA genómico en plantas.

Se siguió el protocolo descrito en (Berendzen et al., 2005) con alguna modificación. Se partió aproximadamente 10mg de material (una hoja joven pequeña) en un tubo eppendorf y se congeló en nitrógeno líquido con tres bolitas de cristal de 3mm (VWR) por tubo. La muestra se molió utilizando el un homogeneizador de muestras. Se añadió a la muestra molida 400uL de disolución de sacarosa: (50 mM Tris-HCl; pH7.5, 300 mM NaCl, 300 mM Sacarosa). Tras una centrifugación de 2 min a 13000rpm se pasaron 300uL del sobrenadante a un tubo con 300uL de isopropanol. La mezcla se incubó 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 5 min a 13000rpm. Se eliminó todo el líquido y se dejó secar el isopropanol en una cabina de flujo. Una vez seca la muestra se añadieron 100 µl de agua estéril y se mantuvo en hielo o congelado a -20°C hasta realizar la PCR. En cada reacción de PCR se utilizó 1ul.

Extracción de plásmido de E. Coli.

Se extrajo DNA plasmídico a pequeña escala utilizando el Kit NZYMiniprep (Nzytech) según las recomendaciones suministradas por la casa comercial. Las extracciones se realizaron a partir de cultivos crecidos durante una noche en 4mL de medio LB suplementado con antibiótico.

Extracción de plásmido de A. tumefaciens

Se extrajo DNA plasmídico mediante el protocolo descrito por Sambrook et al. (1989), partiendo de 4mL de cultivo crecido durante la noche en medio de cultivo suplementado con los antibióticos necesarios. La pureza y rendimiento del DNA plasmídico de Agrobacterium no es suficientemente alta como para realizar análisis por restricción, así que 1ul de la preparación se utilizó para transformar E. coli y a partir de ahí se realizaron los análisis pertinentes.

Purificación de DNA de banda de gel

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo tras recortar la banda con una cuchilla utilizando el kit mi-GEL Extraction Kit (metabion), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Purificación de DNA de producto de PCR

El DNA amplificado mediante PCR se purificó utilizando la totalidad del producto de PCR y el kit mi-PCR Purification Kit (Metabion) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Extracción de RNA de Arabidopsis y síntesis de cDNA

En la extracción de RNA se utilizaron dos kits distintos. En ambos casos se utilizó el homogeneizador como se menciona anteriormente, pero en pequeños grupos para disminuir la posibilidad de descongelación de las muestras.

Para la extracción de RNA para RT-PCR se utilizó el kit E.Z.N.A Plant RNA Kit (OMEGA bio-tek), según las recomendaciones del fabricante. Se añadió el paso de DNAsa de la misma casa comercial. Para RT-PCR se recogieron al menos 9 meristemos por réplica.

Se utilizaron 2 µg de RNA total para sintetizar el cDNA utilizando la SuperScriptR IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo aportado por el fabricante.

Para la extracción de RNA para RNAseq se empleó el kit RNeasy Plant Mini Kit (QUIAGEN) que incluye tratamiento con DNAsa en la columna de la misma casa comercial. Para RNAseq se recogieron al menos 15 meristemos por réplica.

Métodos de clonaje y construcción de plásmidos

A lo largo de la tesis se han utilizado diversos métodos para obtener construcciones que utilizar en las plantas.

Golden Braid

El GoldenBraid (<https://gbcloning.upv.es/>), es un sistema de ensamblaje de DNA que se basa en reacciones de restricción y ligación usando enzimas de tipo IIS (BsaI y BsmBI). De esta manera dos unidades transcripcionales pueden ser ensambladas en un único vector en un solo paso sin modificaciones, convirtiéndose nuevamente en una unidad transcripcional a la que se le pueden añadir otras unidades hasta formar una construcción final multigénica de interés (Sarrion-Perdigones et al, 2011). Para ello en primer lugar hay que convertir los promotores y los genes en unidades transcripcionales del GoldenBraid, un paso conocido como “domesticación”. Este paso consiste en eliminar, mediante PCRs, los puntos de corte de las enzimas utilizadas en la técnica del interior de las secuencias de interés e introducir el resultado, mediante ligación, en un vector pUPD2 que viene incluido en el starter kit de la técnica.

Las secuencias que quisimos domesticar se insertaron en la web de la técnica, obteniendo en cada caso el protocolo de domesticación. En el protocolo se incluyen todos los oligonucleótidos necesarios para realizar PCRs (**Tabla M.4**) que eliminen los sitios de restricción que se necesitan en esta técnica (BsaI y BsmBI) y la ligación necesaria para que estos fragmentos se unan en orden en el vector final de interés pUPD2.

Una vez todas las secuencias de interés se encuentran en vectores pUPD2, éstos pueden ir combinándose para formar construcciones multigénicas. Para ellos se utilizan vectores alpha y omega que a su vez también se pueden ir combinando para conseguir construcciones cada vez de mayor tamaño. Las instrucciones para cada construcción son dadas también por la web pero básicamente implican: 75ng de cada vector origen, 75ng de vector final (pDGB3_alpha/omega), 5-10u de enzima de restricción (BsaI o BsmBI), 3u de ligasa T4 y 1ul de buffer de la ligasa en un volumen final de 10ul. La reacción es en el termociclador: 25 ciclos x (37°C 2min, 16°C 5min).

Los vectores pUPD2, alpha y omega contienen el gen LacZ que se ve truncado al incluir las construcciones, por lo que las ligaciones se transforman en E. coli, que se siembran y se seleccionan en medio con el antibiótico correspondiente a cada vector (cloranfenicol, kanamicina o espectinomicina respectivamente) y X-Gal (40µg/ml), de forma que aquellas colonias que tienen la construcción serán blancas. Posteriormente se comprueban utilizando digestión con enzimas de restricción específicas para cada construcción.

Reacción LR.

Para poder utilizar algunos genes que ya estaban clonados en el laboratorio por trabajos anteriores, se utilizó el sistema de recombinación Gateway para pasar esos genes en vectores PCR8 vectores destino Golden Braid con GW clonado.

También se utilizó para pasar el gen clonado HB21 conservado en la colección REGIA al vector destino pOpON2.

Para la recombinación se utilizó la mezcla de enzimas Gateway LR Clonase II, que cataliza la recombinación *in vitro* entre un clon de entrada (con un gen de interés flanqueado por sitios attL) y un vector destino (con sitios attR).

Para esta recombinación se mezcla en un tubo entre 50 y 150ng (1-7ul) del vector que contiene el fragmento de interés, 150ng del vector de destino, 2uL de la enzima LR clonase II (invitrogen) y tampón TE a pH=8 hasta completar un volumen final de 10ul. La reacción se incuba una hora a 25°C tras lo cual se añade 1ul de la solución de proteinasa K y se incuba a 37°C durante 10 min.

Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados a lo largo de la tesis.

Nombre oligo	Secuencia	Objetivo
Oligos para domesticar y clonar en Golden Braid		
oVSG001	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGAAGCTAGAATTGATGAAGGTG	AtSPL1 gen sin stop domesticar GB F
oVSG002	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCTTGTCCATAGTCCAATAAC	AtSPL1 gen sin stop domesticar GB R
oVSG003	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGAATGCTTGAGCTTAATTAGAGAG	AtSPL1 promotor domesticar seg 1 GB F
oVSG004	GCGCCGTCTCGGCTCGAACATGGCCATATT	AtSPL1 promotor domesticar seg 1 GB R
oVSG005	GCGCCGTCTCGAGGCGAATCATGGTGCTTTTT	AtSPL1 promotor domesticar seg 2 GB F
oVSG006	GCGCCGTCTCGAAAGACCAGTACATGATATGATG	AtSPL1 promotor domesticar seg 2 GB R
oVSG007	GCGCCGTCTCGCTTTCTTTCTTTGACTCACACTA	AtSPL1 promotor domesticar seg 3 GB F
oVSG008	GCGCCGTCTCGCGGCTCCATGTGGTCATTA	AtSPL1 promotor domesticar seg 3 GB R
oVSG009	GCGCCGTCTCGGCCAAAGGTTGACCAAIT	AtSPL1 promotor domesticar seg 4 GB F
oVSG010	GCGCCGTCTCGCTCACATTCATCGATCCAATCAACAAC	AtSPL1 promotor domesticar seg 4 GB R
oVSG035	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGGTGAGGTAGGTCCTCAAGT	AtSPL16 gen sin stop domestic seg1 GB F
oVSG036	GCGCCGTCTCGGAAGACCATTAGTAGTAGCC	AtSPL16 gen sin stop domestic seg1 GB R
oVSG037	GCGCCGTCTCGCTTCGGGAGTGCCCAAAGA	AtSPL16 gen sin stop domestic seg2 GB F
oVSG038	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGATTGAGCCATAATCAAGACC	AtSPL16 gen sin stop domestic seg2 GB R
oVSG039	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGTTACTTACTTAGCACATGAGATT	AtSPL16 promotor domesticar GB F
oVSG040	GCGCCGTCTCGCTCACATTTCTCTCTCTCAAAAATCAAC	AtSPL16 promotor domesticar GB R
Oligos para clonar CRISPR		
oVSG073	ATATATGGTCTCGATTGGATGTGCTATAATCCCAAGTT	DT1-BsF FUL
oVSG074	TGGATGTGCTATAATCCCAAGTTTTAGAGCTAGAAAATAGC	DT1-F0 FUL
oVSG075	AACTGAAATGACCAAAGTAtctcAATCTTTAGCTGACTCTAC	DT2-R0 FUL
oVSG076	ATTATTGGTCTCGAAACTGAAATGACCAAAGTAtctcAA	DT2-BsR FUL
oVSG077	ATATATGGTCTCGATTGAGAAGCAAACCAACACGGGTT	DT1-BsF HB21
oVSG078	TGAGAAGCAAACCAACACGGGTTTTAGAGCTAGAATAAGC	DT1-F0 HB21
oVSG079	AACCGACTCGTTTGTCTTCCACAATCTCTTAGCTGACTCTAC	DT2-R0 HB21
oVSG080	ATTATTGGTCTCGAAACCGACTCGTTTGTCTTCCACAA	DT2-BsR HB21
U6-26p-F	TGTCCAGGATTAGAATGATTAGGC	PCR colony y secuenciación CRISPR
U6-29p-R	AGCCCTCTTCTTTCGATCCATCAAC	PCR colony CRISPR
U6-29p-F	TTAATCCAAACTACTGCAAGCCTGAC	Secuenciación CRISPR
Oligos para genotipar		
oVSG041	TGCTTAGTGTGGTTCCTCAAG	OTUB1 SALK 058652 LP
oVSG042	AAAAGGTTGGTTCGATTTACCG	OTUB1 SALK 058652 RP
oVSG043	TGCTCAAACCACTATCCACC	OTUB1 SALK 149732 LP
oVSG044	GGCCATTTGGTGATATGTTTG	OTUB1 SALK 149732 RP
oVSG045	TCAAGAATGCATACGAAACCCAC	hb21-1 WiscDxLox468G4 LP
oVSG046	GGTCCAAACTTGACCTCCATC	hb21-1 WiscDxLox468G4 RP
oVSG047	ATTTCTTCGAGCCTTGAGCTC	hb40-1 SALK 115125C LP
oVSG048	CGACAAAACCAAAATTCATG	hb40-1 SALK 115125C RP
oVSG049	TACGCCAAACTCAAAAACCCAC	hb53-2 GK-312E06-015817 LP
oVSG050	TCAAGAGTTTCTATGTCGGCTG	hb53-2 GK-312E06-015817 RP
oVSG051	GTCAGCCACGAGAAGCTACAG	nced3-2 GABI 129B08 LP
oVSG052	TTACCGGTTTTGAGATTACG	nced3-2 GABI 129B08 RP
p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	Genotipar WiscDxLox
Lbb1.3	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Genotipar SALK
o8474	ATAATAACGCTCGGACATCTACATTTT	Genotipar GABI
oPBF18	CGAATAGAGGAGCTGCAGAT	SPL14 (SAIL-1247 G10) LP
oPBF58	CACAGTACAGGTGACACTGA	SPL14 (SAIL-1247 G10) RP
oPBF55	TGTCTGCCTGCATTGACCAA	SPL16 (GK 085-F04) LP
oPBF59	AAAAGTTGCATCTTCAACAA	SPL16 (GK 085-F04) RP
oPBF136	AGCGATTTTCTCTGGAAGGC	SPL12 (SALK 017778) LP
oPBF137	ACGGTTCAGAAGATGTGTTGG	SPL12 (SALK 017778) RP
oPBF132	TCGCATAGTCCAACCTGACATG	SPL1 (SALK 200386C) LP
oPBF133	CCAACAGCTCCATCAAAGAAC	SPL1 (SALK 200386C) RP
oVSG081	CACAAAAGATACCCAGAGAGAC	FULg F
oVSG082	GGTATTTGATTAGCACGATC	FULg R
oVSG084	CCACAACAAGGTTGACATCC	HB21g F
oVSG085	CTGGTGATAAGAGAGACCCAATG	HB21g R
oVSG086	GATGTGGAGTATTGCCAACGAAC	GUS F
oVSG087	TTTGCGGTCGCGAGTGAAGATCC	GUS R
oVSG088	TCCAGTATGGACGATTCAAGGC	35S F
oVSG089	GCGAAGGATAGTGGGATTGT	35S R
LD30	TCCCTCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	GFP
LD31	TCCCTCGGGCTTGTACAGCTCGTCCATGC	GFP
Oligos para qRT-PCR		
qHB21 5'	TCGCCGTCTGGTTCCAA	
qHB21 3'	CATCCTCGACTCGTTTGTCTTC	
qHB40 5'	GGAGGAGGAAGAAGACCAAAGG	
qHB40 3'	ACAAACCGTTGCCTCCATCT	
qHB53 5'	GGAGTCAGGGAGGAAGGAGAA	
qHB53 3'	CCACCTGTCTCGGGTCAAGA	
TIP41 F	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA	
TIP 41 R	TCAACTGGATACCCCTTTCGCA	
qFUL F	TTGCAAGATCACAACAATTCTCTCT	
qFUL R	GAGAGTTTGGTTCCTCAACGACGAT	

Construcción de vector para CRISPR

Para poder realizar la edición genética por CRISPR de los loci HB21 y FUL, se utilizó el protocolo de Wang et al., 2015b por el cual utilizando un promotor de células de óvulo se produce un corte controlado por parte de la Cas9 que genera mutantes homocigotos con gran eficiencia en la T₁.

Para ambos casos se introdujo el gen al que queríamos afectar en la web CRISPR-P v2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) para diseñar los sgRNA necesarios para los cortes de la Cas9, seleccionando el snoRNApromoter U6 y el genoma diana *Arabidopsis thaliana*. Como en este caso nuestra intención era conseguir una delección del gen que trunque su función, se buscó hacer un CRISPR con 2 sgRNA. A partir de aquí se intentaron seleccionar secuencias que estuvieran separadas entre sí unas 500pb y cuyo número de cortes fuera de la diana fueran lo menor posibles o afectaran a ser posible a zonas que no fueran exones.

Una vez obtenidas las secuencias se procedió a pedir los oligonucleótidos según el protocolo (**Tabla M.4**). En primer lugar, se realiza una PCR por la cual se obtiene el fragmento que se incluirá en el vector con el que se transformarán las plantas para realizar el CRISPR (pHEE401). Una vez que tenemos esta PCR hecha, se procede a hacer una digestión y ligación del vector destino y el fragmento obtenido en la primera PCR, también según el protocolo. Esta ligación se transforma en *E.coli* y se selecciona con kanamicina. Las bacterias se comprueban por PCR colony y una vez seleccionadas se realiza una miniprep que se manda a secuenciar para comprobar que se haya construido bien el vector. Finalmente se transforma en *Agrobacterium* y se transforma *Arabidopsis* según se explicará posteriormente.

La T₁ se siembra en higromicina y esta T₁ ya es genotipada para encontrar plantas homocigotas en la delección de la parte de los genes que nos interesa, mandando a secuenciar aquellas bandas que parecían correctas.

Vectores utilizados.

Las características, uso y origen de los vectores utilizados a lo largo de esta tesis doctoral están resumidos en la **Tabla M.5**, así como los plásmidos obtenidos. El procedimiento para su construcción se detalla en los apartados siguientes.

Tabla M.5. Vectores utilizados y obtenidos en este trabajo.

Vector	Características	Uso	Origen/Referencia
Vectores origen			
PCR8/TOPO/GW	SpectR. Vector de origen para el sistema de recombinación Gateway	Clonación de producto de PCR	Invitrogen
pUPD2	CloranfenicolR. Vector de origen para el sistema Golden Braid	Clonación de producto de PCR	GoldenBraid 2.0 Kit
pDGB3_alpha1	KanR. Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Golden Braid.	Combinación de productos GoldenBraid	GoldenBraid 2.0 Kit
pDGB3_alpha2	KanR. Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Golden Braid.	Combinación de productos GoldenBraid	GoldenBraid 2.0 Kit
pDGB3_omega1	SpectR. Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Golden Braid.	Combinación de productos GoldenBraid	GoldenBraid 2.0 Kit
pDGB3_omega2	SpectR. Vector binario de destino mediante sistema de recombinación Golden Braid.	Combinación de productos GoldenBraid	GoldenBraid 2.0 Kit
pOpON2	Vector de expresión inducible por dexametasona. Specr (bacteria) y Kanr (planta)	LR para obtención de vector	Craft et al., 2005
pHEE401	Vector destino Crispr	Clonación de producto de PCR	Wang et al., 2015
Vectores utilizados o obtenidos			
pSPL1	Vector pUPD2. Region promotora SPL1.	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	Este trabajo
pSPL16	Vector pUPD2. Region promotora SPL16.	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	Este trabajo
SPL16	Vector pUPD2. Fragmento genómico del gen SPL16 desde ATG a STOP (sin STOP)	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	Este trabajo
GUS	Vector pUPD2, gen GUS para líneas reporteras	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	GoldenBraid 2.0 Kit
35S	Vector pUPD2, promotor 35S para sobreexpresiones	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	GoldenBraid 2.0 Kit
Hygro	Vector pUPD2, gen de resistencia a higromicina	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	GoldenBraid 2.0 Kit
BASTA	Vector pUPD2. Gen de resistencia a BASTA	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	GoldenBraid 2.0 Kit
YFP	Vector pUPD2. Gen YFP para construcciones marcadoras	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	GoldenBraid 2.0 Kit
DsRed	Vector pUPD2. Gen DsRed bajo el promotor ¿? para selección de semillas fluorescentes.	Plásmido intermediario para recombinación mediante Golden Braid	GoldenBraid 2.0 Kit
pSPL1::GUS	Obtenido mediante Golden Braid.	Generación de líneas reporteras GUS bajo promotor SPL1.	Este trabajo
pSPL16::GUS	Obtenido mediante Golden Braid.	Generación de líneas reporteras GUS bajo promotor SPL16	Este trabajo
pSPL16::SPL16::YFP	Obtenido mediante Golden Braid.	Generación de líneas reporteras con la proteína fusión SPL16-YFP	Este trabajo
pHEE401::FUL	Vector pHEE401. Obtenido mediante clonaje Golden Gate siguiendo el protocolo descrito por Wang et al. 2015 Genome Biology	Generación líneas CRISPR del gen FUL	Este trabajo
HB21 ^{ind}	Vector pOpON2.1 con cDNA correspondiente a HB21 obtenido de la colección REGIA	Generación de líneas inducibles de HB21	Este trabajo
pHEE401::HB21	Vector pHEE401. Obtenido mediante clonaje Golden Gate siguiendo el protocolo descrito por Wang et al. 2015 Genome Biology	Generación líneas CRISPR del gen HB21	Este trabajo
pMDC32::SPL14	Vector pMDC32.	Sobreexpresión del gen SPL14.	Tesis Patricia Ballester, 2018.

PCR

Amplificación de DNA para clonaje

Para la amplificación de los diferentes DNAs obtenidos en este trabajo se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction). Para la amplificación de DNA para clonaje es importante que no haya errores en el proceso por lo cual se empleó una polimerasa de alta fidelidad que posee una tasa de error mínima y actividad exonucleasa 3'-5'. Las condiciones generales seguidas fueron: 0.8 μ M de cada oligonucleótido; 0.2 mM de una mezcla equimolar de dNTPs; 0.5 U Taq Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs); tampón de PCR 1X (New England Biolabs) y 200 ng de DNA molde. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies) con una incubación inicial de 95°C 2 min; seguida de 30 a 35 ciclos de 95°C 30 seg, $T_{\text{anillamiento}}$ 30 seg y 72 °C $t_{\text{extensión}}$; con una incubación final de 72°C 10 min. La temperatura de anillamiento ($T_{\text{anillamiento}}$) se estimó en función de la temperatura de fusión aproximada (T_m) de los oligonucleótidos empleados en la reacción.

El tiempo de extensión ($t_{\text{extensión}}$) dependía de la longitud del fragmento a amplificar que con esta polimerasa fue de 30 seg/kb.

Amplificación de DNA para genotipados

El DNA molde de la reacción en este caso procedía de la extracción del gDNA de las diferentes plantas a analizar, utilizando 1 μ l del volumen final de extracción. Las condiciones generales seguidas fueron: 1-1,25 μ M de cada oligonucleótido; 1.25 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; MgCl 1.25 mM; 1 U Taq DNA polimerasa (Promega); Tampón de PCR 5X (Promega) y DNA molde en concentración variable (1 μ l).

Las reacciones se llevaron a cabo en el mismo termociclador que el apartado anterior con una incubación inicial de 95°C 5 min; seguida de 30 ciclos de 95°C 40 s, $T_{\text{anillamiento}}$ 45 s y 72°C $t_{\text{extensión}}$; con una incubación final de 72°C 5 min. Las temperaturas y tiempos concretos para cada genotipado se ($T_{\text{anillamiento}}$) se estimaron en función de la temperatura de fusión aproximada (T_m) de los oligonucleótidos empleados en la reacción. El tiempo de extensión ($t_{\text{extensión}}$) dependía de la longitud del fragmento a amplificar y, en general, con esta polimerasa, se utilizó 60 seg por kb.

Para comprobar que la reacción de PCR había funcionado se realizó una electroforesis horizontal añadiendo 10 μ l de la reacción en un gel de agarosa (ver apartado electroforesis de DNA en geles de agarosa). Los oligonucleótidos empleados (**Tabla M.4**)

fueron sintetizados por la empresa INVITROGEN (<http://www.invitrogen.com>) con grado de purificación máximo.

2.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para el análisis de expresión de los genes en estudio se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Se pidieron oligonucleótidos descritos en la bibliografía para cada gen (**Tabla M.4**).

Las mezclas de reacción para la RT-qPCR se prepararon en placas de 96 pocillos (Applied Biosystems™), en un volumen final de 10 μ L, con 2 μ L de cDNA (22,2 ng/ μ L), 2 μ L de HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Biodyne) y 0,4 μ L de cada uno de los oligonucleótidos (5 μ M). La placa se transfirió a un termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher) acoplado con el programa informático específico de la marca, donde se llevó a cabo la amplificación siguiendo las condiciones establecidas por el fabricante. Estas condiciones consistieron en una atemperación de 2 minutos a 50 °C, una desnaturalización de 10 minutos a 95 °C, y 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consistía en una desnaturalización de 15 segundos a 95 °C y una elongación de 1 minuto a 60 °C. Para cada cDNA se realizaron tres replicas técnicas. Los niveles relativos de expresión se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde: Ct (Ciclo umbral o Threshold Cycle), es el ciclo en el que empieza a detectarse la amplificación por encima del nivel basal de fluorescencia. Para cada muestra: $\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen endógeno}$ $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ muestra referencia}$. En los análisis se usó como gen constitutivo normalizador el gen TIP41. El cálculo comparativo Ct es válido cuando las eficacias de amplificación de los genes en estudio y el gen calibrador son similares.

Electroforesis de DNA en de agarosa

Para la separación de fragmentos de DNA, se utilizaron geles de agarosa con una concentración 1% en tampón TBE 1X [Tris 44.5 mM (pH 8.0), ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1.25 mM], según se describe en Sambrook et al. (1989). Además, los geles contenían 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron en sistemas horizontales “Sub-Cell GT” y “Mini-Sub Cell GT” conectados a una fuente de alimentación “PowerPack™ Basic” de “Bio-Rad” (www.bio-rad.com).

Digestión de DNA mediante enzimas de restricción

Para seleccionar con qué enzimas digerir las construcciones y comprobar si eran correctas, se utilizó la web Benchling (www.benchling.com) ubicando las distintas enzimas que poseemos en el laboratorio en el mapa vectorial de cada vector y seleccionando

aquellas que dieran lugar a fragmentos fáciles de diferenciar en una electroforesis y cuyas enzimas fueran compatibles entre ellas. Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se llevaron a cabo siguiendo protocolos estándar; para cada enzima se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por la casa comercial. En los casos de combinación de enzimas se utilizó la herramienta DoubleDigest Calculator de de Thermo Scientific para aplicar las condiciones óptimas a la digestión. El análisis de los fragmentos se realizó en geles de agarosa como los explicados en el apartado pertinente.

Secuenciación de DNA y análisis de secuencias.

La determinación de la secuencia de fragmentos amplificados por PCR y clonados en las diferentes construcciones se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Valencia). Los análisis de las secuencias de DNA se realizaron en la web Benchling.

Transformación genética

Transformación genética bacteriana.

Para llevar a cabo la transformación de bacterias por electroporación, se descongeló en hielo una alícuota de 40 μ l de células competentes a la que se añadió 1 μ l de la reacción de ligación o, aproximadamente, 100ng de DNA en el caso de que se tratara directamente de un plásmido. La mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación, con 0,1 cm de separación entre los electrodos, de “Bio-Rad”, que previamente se había enfriado en hielo. El pulso eléctrico se aplicó con un aparato “GenePulser™” de “Bio-Rad” bajo las siguientes condiciones: 200 Ω , 25 μ F, 1.8 kV.

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

Transformación genética de *Arabidopsis thaliana*.

Para transformar plantas silvestres y los correspondientes mutantes de *Arabidopsis* se siguió el protocolo de infiltración *floral dip* descrito en Bechtold et al. (Bechtold et al., 1993) con algunas modificaciones.

Aproximadamente 10 semillas de plantas silvestres de *Arabidopsis* (Col-0) se cultivaron en macetas de 12 cm de diámetro en condiciones de día largo. Unas dos semanas después de la siembra, se eliminaron algunas plantas para facilitar el crecimiento homogéneo de la población. Cuando la altura de las plantas era de unos 10 cm,

aproximadamente tras un mes de cultivo, se eliminó el ápice de la inflorescencia principal, induciendo de este modo la proliferación de las inflorescencias de roseta. Tras la decapitación del ápice, las plantas se cultivaron durante 4 días más en día largo antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración, se inoculó la cepa C58 pMP90 de *A. tumefaciens* con la construcción de interés, en un tubo de 50 ml con 10 ml de LB más rifampicina y kanamicina a las concentraciones indicadas en la **Tabla. M.3**. Este precultivo se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28 °C con agitación de 200 rpm. A la mañana siguiente, se inoculó el precultivo en un matraz de 1 L que contenía 600 ml de medio LB con kanamicina. Este cultivo se incubó en las mismas condiciones durante 48 horas. El día de la infiltración se centrifugó el cultivo, a 6000 rpm durante 15 min, y el sedimento obtenido se resuspendió en 200 ml de medio de infiltración (2.2 g/l de sales MS, 5% p/v de sacarosa, 100 mg/l MES, pH 5.9) al que se le había añadido surfactante “Silwet L.77” (“Lehle Seeds”), a una concentración final de 0.05% (v/v).

Antes de la infiltración, se eliminaron todas las flores abiertas y las silicuas fertilizadas de las plantas. Para llevar a cabo la infiltración, las inflorescencias se sumergieron en un recipiente con los 200 ml de la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración durante 5 min aproximadamente. Posteriormente las plantas se secaron ligeramente en un papel absorbente, y se cubrieron con bolsas de plástico. Luego se llevaron al invernadero y un día después se les retiró el plástico. Las plantas permanecieron en el invernadero hasta la recolección de las semillas. Una vez recolectadas las semillas se secaron a 37°C durante 5 días.

Selección de semillas transgénicas y obtención de líneas homocigotas con una copia del transgén.

Para identificar transformantes primarios (T_1), las semillas procedentes de las plantas transformadas se sembraron en placas Petri de 15 cm de diámetro, unas 3000 semillas por caja, con medio de selección (kanamicina, higromicina o Basta) como se explica en un apartado anterior. Tras unos 10 días de cultivo *in vitro*, las plantas resistentes, verdes y con raíces desarrolladas, se trasplantaron a tierra y se cultivaron en el invernadero según las condiciones previamente descritas. La identificación de transformantes primarios también se llevó a cabo mediante la utilización de fluorescencia, ya que ciertas construcciones contenían el gen DsRed bajo el promotor At2S23, que genera semillas fluorescentes que pueden ser rojas a simple vista.

Para seleccionar una T₂ con una única copia del transgén, se sembraron 60 semillas por línea en placas Petri de 9cm de diámetro. Las semillas se sembraron con palillo separándolas entre sí para que fuera sencillo discernir cuáles se desarrollaban bien y cuáles mueren por la selección tras 10 días creciendo. Aquellas placas en las que sólo un tercio de las semillas crecieran bien son las que tienen una única copia del gen al cumplirse la relación 3:1. En el caso de las semillas que se seleccionan por fluorescencia, se cogió una silicua de cada línea y se observó en la lupa y se contó el número de semillas fluorescentes buscando también aquellas con la relación 3:1.

Para obtener la T₃ homocigota, se trasplantaron las plantas de la T₂ de una única copia resistentes y se obtuvieron sus semillas. A continuación, se repitió el proceso de selección de la T₂ de una copia pero buscando aquellas líneas en que hubiera un 100% de resistencia en placa o todas ellas tuvieran fluorescencia, considerándose éstas como homocigotas.

Análisis fenotípico.

Recuento de hojas.

Para el estudio del tiempo de alzado y de floración, se realizó un conteo en día largo y corto del número de hojas desde que se forman las hojas verdaderas. Cada 3-4 días se fue al invernadero y se marcaron las hojas nuevas producidas anotando su número. Se apuntó el día en que se produjo el alzado y luego se continuó contando el número de hojas producidas en el ápice principal hasta la primera flor, que se apuntó como día de floración. Posteriormente se sumaron los números anotados para tener el número de hojas totales producidas hasta el alzado y hasta la floración.

Recuento de número de frutos.

El tiempo de la parada de la floración viene marcado por el número de flores producidas por el ápice principal desde que florece hasta que deja de crecer (parada) o da lugar a flor terminal cuando corresponde. Para saber si una planta tiene la parada proliferativa adelantada o retrasada, se cuentan las flores y frutos producidos en la inflorescencia principal en plantas modificadas y se compara con el número producido por las plantas silvestres.

Estudios relacionados con ácido abscísico

Aplicación de ABA.

Una semana tras el alzado del tallo se aplicó ácido abscísico 70 µM (ABA) o un tratamiento control (*mock*). Para ello, se añadió una gota (3µl) de solución ABA (70mM,

0,015% Silvet L77) o *mock* (0,015% Silvet L77) en el meristemo apical. El tratamiento se repitió durante tres días y se observaron las plantas tres días más tarde.

Placas de sacarosa.

Para el estudio de resistencia a sacarosa que puede indicar tener la ruta del ABA afectada, se sembraron placas suplementadas con sacarosa. Así, las placas se realizaron según el apartado “Cultivo de *Arabidopsis in vitro*” suplementadas con sacarosa hasta llegar a tres concentraciones distintas: 200mM, 250mM y 300mM. Las plantas se sembraron también como en el apartado pertinente sin modificaciones.

Inducción con Dexametasona

Una semana tras el alzado del tallo de las líneas que incluían la construcción *pOpON:HB21*, se realizó la inducción de la expresión de HB21 mediante la aplicación de un tratamiento con dexametasona 10 μ M (DEXA) o un tratamiento control (*mock*). Para ello, se añadió una gota (3 μ l) de solución DEXA (10 μ M, 0,015% Silvet L77) o *mock* (0,015% Silvet L77) en el meristemo apical. Seis horas después del tratamiento DEXA/*mock* se recogieron los ápices de las inflorescencias a los que se les había eliminado el mayor número posible de yemas florales, en nitrógeno líquido.

Para el RNAseq se recogieron tres replicas biológicas del tratamiento *mock* y otras tres réplicas del tratamiento DEXA. Cada muestra contaba con al menos 15 ápices.

En el caso de análisis fenotípicos, las muestras se observaron tres días después del tratamiento y las fotos se realizaron una semana después del tratamiento.

Para comprobar antes de los experimentos que las líneas estuvieran funcionando correctamente se realizó inducción fuerte en hoja, usando dexametasona al 20 μ M y aplicándola con un pincel en las hojas. Las muestras se cogieron 5 horas más tarde y se realizó GUS rápido (explicado en los siguientes apartados).

Estudios de expresión.

Detección GUS.

La actividad GUS puede ser determinada con tinción histoquímica mediante el sustrato cromogénico 5-bromo-4-clor-3-indolil glucurónido (X-Glu), indicando las zonas teñidas de azul, los dominios físicos de expresión del gen interés en los órganos analizados.

GUS rápido para selección de líneas expresoras.

Para realizar detecciones poco precisas se siguió un protocolo rápido. En este caso únicamente se pretendía descartar plantas que no fueran portadoras del gen delator, bien

porque eran necesarias para la realización de cruces o bien para descartar plantas de generaciones F1 y F2, procedentes de un cruce con una línea portadora del gen delator GUS. Se cogieron flores o frutos en placas de 96 pocillos (Iwaki microplate) con el tampón de tinción (NaH_2PO_4 13,42mM a pH 7,2; Na_2HPO_4 11,58 mM a pH 7,2; ferrocianuro potásico 0,5 mM, ferricianuro potásico 0,5 mM, EDTA 10mM y Tritón X-100 al 0,2 %) suplementado con X-Glu 2 mM. Las muestras se incubaron durante una noche a 37°C y en oscuridad. Posteriormente las muestras se observaron y en los casos en los que la señal no se detectaba con claridad previamente a la visualización las muestras se sometieron a varios lavados con etanol 70% y se observaron en una lupa binocular.

GUS estricto para detección específica de tejido.

Para realizar detecciones GUS más precisas se siguió el protocolo descrito por Kirsten Bomblies en el manual de Arabidopsis (Weigel 2002) pág.243-245 con algunas modificaciones.

Las inflorescencias de plantas portadoras de construcciones con el gen delator GUS se recogieron en acetona fría al 90%, en esta solución se mantuvieron durante 20 min a T^a ambiente. A continuación, se hizo un lavado de 5 min con agua. Posteriormente, las muestras fueron infiltradas al vacío durante 20 min, o en su defecto hasta que las muestras cayeron al fondo, con el tampón de tinción (tampón fosfato 50mM pH 7, ferricianuro potásico 2mM, ferrocianuro potásico 2mM, Tritón X-100 0,2%) suplementado con X-Glu 2mM y se incubaron a 37°C y oscuridad toda la noche. El ferrocianuro y el ferricianuro tamponan el estado redox del tampón de tinción y el producto derivado de X-Glu precipita en el lugar donde se localiza la proteína GUS, indicando por tanto la localización espacial y temporal del gen cuyo promotor controla la expresión del gen GUS en la planta. El tampón de tinción se elimina con una serie de etanol al 20%, 35% y 50% a T^a ambiente durante 30 min cada serie, y a continuación, se fijaron las muestras en FAE (50%etanol, 10%ácido acético glacial, 5%formaldehído) durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se pasaron a etanol 70%, en esta solución se pueden mantener indefinidamente.

Nota: Las concentraciones elevadas de ferrocianuro y ferricianuro restringen el nivel de señal de GUS, mientras que las concentraciones más bajas permiten detectar señales GUS más débiles (Sessions et al. 1999).

Hidrato de cloral.

Se utilizó el protocolo de Sioux Christensen (Pelletier *et al.*, 1997) con alguna modificación. Mediante este protocolo, se aclaran los tejidos vegetales, que se vuelven transparentes, permitiendo analizar la señal GUS mediante el uso de un microscopio. Es

importante realizar todo el proceso en una campana de extracción de gases ya que el hidrato de cloral es tóxico. Una vez las muestras fueron fijadas, incubadas con el tampón de detección y deshidratadas hasta etanol al 70% (apartado anterior), se quitó el etanol al 70% y se reemplazó con una disolución de hidrato de cloral: Hidrato de cloral/ glicerol/ agua (8g/1ml/2ml). Se mantuvo en esta disolución un día. Posteriormente se montaron las muestras sobre portaobjetos.

Las muestras se colocaron sobre el portaobjetos al que previamente se le había añadido disolución de hidrato de cloral (normalmente un mínimo de 200 μ l). Para evitar que las muestras se aplastaran con el cubreobjetos se colocó en los extremos del portaobjetos unas pegatinas pequeñas (preferiblemente transparentes para que no destiñan con el hidrato de cloral) de forma que quedara espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Antes de analizar en el microscopio las muestras, es muy importante sellar (con laca de uñas transparente en este caso) los portaobjetos ya que la disolución de hidrato de cloral puede dañar las lentes del microscopio. Las muestras fueron observadas con iluminación de campo claro, utilizando la técnica Normaski que permite detectar cierto volumen en las muestras.

Fluorescencia.

Para poder estudiar el efecto en la expresión de la inducción de HB21 sobre ciertos genes, utilizamos líneas con dichos genes fusionados a GFP. Para poder observar el efecto específicamente en el meristemo, se podó el ápice apical y con ayuda de una placa con MS al 1,5% se procedió a eliminar todas las inflorescencias y botones florales que rodeaban el meristemo, utilizando la lupa para ayudarnos en la observación. Los meristemos podados se observaron posteriormente al microscopio confocal como se explica en apartados siguientes.

Obtención de fotografías.

Fotografía a bajo aumento.

Para observar tejidos a bajo aumento (entre 5 y 20 aumentos) se utilizó una lupa binocular Leika MZ16F, que estaba acoplada a una cámara digital LeikaDMC6200. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software propio de la lupa.

Microscopía óptica.

Los meristemos aclarados y diseccionados se visualizaron con un microscopio óptico Leica DM5000 B, utilizando iluminación de campo claro. El microscopio estaba acoplado a

una cámara digital Leica DFC550. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del software de análisis de imagen LAS (Leica Application Suite) LAS v.9.

Microscopía confocal.

Se utilizó un microscopio confocal Stellaris 8 FALCON (Leica) usando un objetivo de inmersión de 40X. La GFP y la YFP se excitaron con un laser de 488 nm, y su emisión se recogió entre 500 nm y 520 nm (máximo de emisión a 509 nm). La clorofila se excitó con el mismo laser, y su emisión se recogió entre 660 nm y 690 nm.

“Software” empleado para el tratamiento de imágenes.

El procesado y tratamiento de imágenes de microscopía se realizó con GIMP, un programa de procesamiento de imágenes de dominio público que funciona tanto en Windows como Mac y Linux. La página web oficial es <http://www.gimp.org.es/>, en ella se puede realizar la descarga y contiene manuales de uso para las diferentes aplicaciones del programa.

También se utilizó el software ImageJ principalmente para el análisis de las fotografías obtenidas en el microscopio confocal.

Análisis transcriptómico: RNAseq.

Para el RNAseq se cogieron al menos 15 meristemas lo más diseccionados posibles por muestra, usando tres réplicas biológicas en cada caso. La extracción del RNA se realizó según se explica en el apartado anterior “Extracción de RNA se Arabidopsis y síntesis de cDNA”. La calidad de esos RNA se evaluó mediante un Bioanalyzer en el servicio de genómica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Las muestras se enviaron posteriormente a Inglaterra donde se realizó el RNAseq en la compañía Novogene, donde se solicitó un RNA-seq eucariótico que incluía la preparación de la librería y la secuenciación (*20M raw reads, 6G raw data/sample on average, fastq format*).

Análisis bioinformático.

Las secuencias obtenidas fueron preprocesadas y analizadas por el Servicio de Bioinformática del IBMCP.

El análisis fue hecho con FastQC para el análisis de calidad de las raw reads y clean reads (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), y cutadapt para la limpieza de adaptadores y regiones de mala calidad (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>). Se utilizó HISAT2 para el mapeo contra el genoma de Arabidopsis (<http://daehwankimlab.github.io/hisat2/>), y htseq-count para el read counting (<https://htseq.readthedocs.io/en/master/htseqcount.html>).

Finalmente, para el análisis de expresión diferencial se utilizó DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/DESeq2/inst/doc/DESeq2.html>).

Para identificar los genes diferencialmente expresados se calculó la tasa de cambio o *fold change* (FC), dividiendo los valores de RPKM o TPMS de una muestra entre los de la otra muestra. Para poder interpretar con mayor facilidad la expresión diferencial de los diferentes genes, los valores de FC fueron transformados a una escala log₂, donde un FC de ± 1 equivale al doble de expresión de una muestra frente a la otra. También se aplicaron los tests estadísticos correspondientes al p-value y al “False Discovery Rate” (FDR) para tener un nivel de significatividad del cambio de expresión.

Para la selección de genes diferencialmente expresados aplicamos como parámetros de selección un FC $> 0,75$ y $< -0,75$, p-value $< 0,05$ y FDR $< 0,05$ en el análisis del cuádruple mutante *spl-quad* y de FC > 1 y < -1 , p-value $< 0,05$ y FDR $< 0,05$ para el análisis de la inducción de HB21.

Análisis de enriquecimiento de categorías de ontología génica

Se realizó mediante la aplicación BiNGO (Maere et al., 2005) implementada por Cytoscape (Shannon et al., 2003), comparando frente a la base de datos de Arabidopsis y poniendo el foco en la categoría Procesos Biológicos.

Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos de significatividad de los diferentes experimentos se realizaron utilizando la plataforma virtual Astatsa (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/).



BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Lwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K. (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought-and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell*, 9, 1859–1860.
- Aguilar-Martínez, J. A., Sinha, N. (2013). Analysis of the role of arabidopsis class I TCP genes AtTCP7, AtTCP8, AtTCP22, and AtTCP23 in leaf development. *Frontiers in Plant Science*, 4(406), 1–13.
- Albani, M. C., Coupland, G. (2010). Comparative analysis of flowering in annual and perennial plants. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 91, Issue C, pp. 323–348). Academic Press Inc.
- Ali, F., Qanmber, G., Li, F., Wang, Z. (2022). Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 35, pp. 199–214). Elsevier B.V.
- Alvarez, J., Guli, C. L., Yu, X. -H, & Smyth, D. R. (1992). terminal flower: a gene affecting inflorescence development in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 2(1), 103–116.
- Amasino, R. (2009). Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. In *Genome biology* (Vol. 10, Issue 7, p. 228).
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant Journal*, 61(6), 1001–1013.
- Aukerman, M. J., Sakai, H. (2003). Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *Plant Cell*, 15(11), 2730–2741.
- Balanza, V., Navarrete, M., Trigueros, M. y Ferrandiz, C. (2006). Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. *J. Exp. Bot.* 57, 3457-3469.
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., & Ferrándiz, C. (2014). Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. *Journal of Experimental Botany*, 65(4), 1193–1203.
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M. F., Ferrándiz, C. (2019). Inflorescence Meristem Fate Is Dependent on Seed Development and FRUITFULL in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, 10(1622).
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M. F., Kaufmann, K., Angenent, G. C., Bemer, M., Ferrándiz, C. (2018). Genetic control of meristem arrest and life span in Arabidopsis by a FRUITFULL-APETALA2 pathway. *Nature Communications*, 9(565).
- Ballester, P. (2016) Los genes NGATHA. Análisis genético y molecular de su papel en la morfogénesis del gineceo de Arabidopsis thaliana. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Bartrina, I., Jensen, H., Novák, O., Strnad, M., Werner, T., Schmölling, T. (2017). Gain-of-function mutants of the cytokinin receptors AHK2 and AHK3 regulate plant organ size, flowering time and plant longevity. *Plant Physiology*, 173(3), 1783–1797.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T., Schmölling, T. (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 23(1), 69–80.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C. R. Acad. Sci.* 316, 1194-1199.
- Bemer, M., Van Mourik, H., Muñío, J. M., Ferrándiz, C., Kaufmann, K., Angenent, G. C. (2017). FRUITFULL controls SAUR10 expression and regulates Arabidopsis growth and architecture. *Journal of Experimental Botany*, 68(13), 3391–3403.
- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I. E., Ülker, B. (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between Arabidopsis thaliana ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods*, 1(4), 1–15.

- Bleeckerl, A. B., Patterson, S. E. (1997). Last Exit: Senescence, Abscission, and Meristem Arrest in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 9, 1169–1170.
- Bouché, F., Lobet, G., Tocquin, P., & Périlleux, C. (2016). FLOR-ID: An interactive database of flowering-time gene networks in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1167–D1171.
- Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M., Simon, R. (2000). Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*, 289(5479), 617–619.
- Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M., & Simon, R. (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129(2), 565–575.
- Bray, E. A. (2002). Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the Arabidopsis genome. In *Plant, Cell and Environment* (Vol. 25, Issue 2, pp. 153–161).
- Bruns, J. M., Fogel, T. D., White, R., Palmer, T. J., Bruns, J. D., Szaro, T. D., Malec ; Koo, T. M., Molina, C. D., Natarajan, R., Mohan, K., Ingelby, V., Bioi ; Danielson, K., Molina, R. M., Trappe, R., Kasuga, J. M., Woods, T., Woodward, C., Mitchelson, S. (1985). The Coevolutionary Process. *Evolutionary Biology of Parasites*, 77(9), 495–509.
- Bustamante, M., Matus, J. T., Riechmann, J. L. (2016). Genome-wide analyses for dissecting gene regulatory networks in the shoot apical meristem. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Issue 6, pp. 1639–1648). Oxford University Press.
- Cardon, G., Hö, S., Klein, J., Nettessheim, K., Saedler, H., Huijser, P. (1999). Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene*, 237, 91–104.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., Davies, B. (2012). The TOPLESS interactome: A framework for gene repression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(1), 423–438.
- Chao, L. M., Liu, Y. Q., Chen, D. Y., Xue, X. Y., Mao, Y. B., Chen, X. Y. (2017). Arabidopsis Transcription Factors SPL1 and SPL12 Confer Plant Thermotolerance at Reproductive Stage. *Molecular Plant*, 10(5), 735–748.
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A., Mao, L. (2010). SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: Star players for plant growth and development. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 52, Issue 11, pp. 946–951).
- Chen, F., Li, Y., Li, X., Li, W., Xu, J., Cao, H., Wang, Z., Li, Y., Soppe, W. J. J., & Liu, Y. (2021). Ectopic expression of the Arabidopsis florigen gene FLOWERING LOCUS T in seeds enhances seed dormancy via the GA and DOG1 pathways. *Plant Journal*, 107(3), 909–924.
- Clark, S. E., Williams, R. W., & Meyerowitz, E. M. (1997). The CLAVATA1 Gene Encodes a Putative Receptor Kinase That Controls Shoot and Floral Meristem Size in Arabidopsis. *Cell*, 89, 575–585.
- Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martinez, A., Jepson, I., Tsiantis, M., Moore, I. (2005). New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in Arabidopsis. *Plant Journal*, 41(6), 899–918.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., Coen, E. (1999). The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant Journal*, 18(2), 215–222.
- Dinneny, J. R., Weigel, D. y Yanofsky, M. F. (2005). A genetic framework for fruit patterning in Arabidopsis thaliana. *Development* 132, 4687–96.
- Drews, G. N., Bowman, J. L., Meyerowitz, E. M. (1991). Negative Regulation of the Arabidopsis Homeotic Gene AGAMOUS by the APETALA2 Product. *Cell*, 65, 991–1002.
- Engvild, K. C. (1989). The death hormone hypothesis. *Physiologia Plantarum*, 77, 282–285.
- Fernando, V. C. D., Schroeder, D. F. (2016). Role of ABA in Arabidopsis Salt, Drought, and Desiccation Tolerance. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives* (Vol. 22, pp. 507–524). *InTech*.

- Ferrándiz, C., Liljegren, S. y Yanofsky, M. (2000a). FRUITFULL negatively regulates the SHATTERPROOF genes during Arabidopsis fruit development. *Science* 289, 436-438.
- Ferrándiz, C., Gu Q, Martienssen R, Yanofsky M F. (2000b). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development*, 127, 725–734.
- Fouracre, J. P., Scott Poethig, R. (2019). Role for the shoot apical meristem in the specification of juvenile leaf identity in Arabidopsis. *PNAS*, 116(20), 10168–10177.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Höhmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H., Huijser, P. (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant Journal*, 49(4), 683–693.
- García-Molina, A., Xing, S., Huijser, P. (2014). Functional characterisation of Arabidopsis SPL7 conserved protein domains suggests novel regulatory mechanisms in the Cu deficiency response. *BMC Plant Biology*, 14(1).
- Girin, T., Sorefan, K. y Ostergaard, L. (2009). Meristematic sculpting in fruit development. *J Exp Bot* 60, 1493-502.
- Goetz, M., Rabinovich, M., Smith, H. M. (2021). The role of auxin and sugar signaling in dominance inhibition of inflorescence growth by fruit load. *Plant Physiology*, 187(3), 1189–1201.
- González-Grandío, E., Pajoro, A., Franco-Zorrilla, J. M., Tarancon, C., Immink, R. G. H., Cubas, P. (2017). Abscisic acid signaling is controlled by a BRANCHED1/HD-ZIP cascade in Arabidopsis axillary buds. *PNAS*, 114(2), E245–E254.
- González-Suárez, P., Walker, C. H., Bennett, T. (2023). FLOWERING LOCUS T mediates photo-thermal timing of inflorescence meristem arrest in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology*, 00, 1–14.
- Gou, J. Y., Felippes, F. F., Liu, C. J., Weigel, D., Wang, J. W. (2011). Negative Regulation of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-Targeted SPL Transcription Factor. *Plant Cell*, 23(4), 1512–1522.
- Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky M F, Martienssen R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development*, 125, 1509–1517.
- Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Gu, X., Ge, S., Yang, J., Luo, J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*, 418(1–2), 1–8.
- Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., Laux, T. (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development*, 131(3), 657–668.
- Hellens, R. P., Allan, A. C., Friel, E. N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M. D., Karunairetnam, S., Gleave, A. P., Laing, W. A. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 1(13), 1–14.
- Hempel, F. D., Weigel, D., Mandel, A., Ditta, G., Zambryski, P. C., Feldman, L. J., & Yanofsky, M. F. (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in Arabidopsis. *Development*, 124, 3845–3853.
- Hensel, L., Nelson, M. A., Richmond, T. A., Bleecker, A. B. (1994). The Fate of Inflorescence Meristems Is Controlled by Developing Fruits in Arabidopsis'. *Plant Physiol*, 106, 863–876.
- Ho, W. W. H., Weigel, D. (2014). Structural features determining flower-promoting activity of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T. *Plant Cell*, 26(2), 552–564.
- Huijser, P., & Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. In *Development* (Vol. 138, Issue 19, pp. 4117–4129).

- Hyun, Y., Richter, R., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Porri, A., & Coupland, G. (2016). Multi-layered Regulation of SPL15 and Cooperation with SOC1 Integrate Endogenous Flowering Pathways at the Arabidopsis Shoot Meristem. *Developmental Cell*, 37(3), 254–266.
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Journal*, 27(4), 325–333.
- Jeong, H. L., Seong, J. Y., Soo, H. P., Hwang, I., Jong, S. L., Ji, H. A. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes and Development*, 21(4), 397–402.
- Jha, P., Ochatt, S. J., Kumar, V. (2020). WUSCHEL: a master regulator in plant growth signaling. In *Plant Cell Reports* (Vol. 39, Issue 4, pp. 431–444). Springer.
- Jiang, X., Chen, P., Zhang, X., Liu, Q., Li, H. (2021). Comparative analysis of the SPL gene family in five Rosaceae species: *Fragaria vesca*, *Malus domestica*, *Prunus persica*, *Rubus occidentalis*, and *Pyrus pyrifolia*. *Open Life Sciences*, 16(1), 160–171.
- Jofuku, K. D., Den Boerib, B. G. W., Montaguib, M. Van, Okamuroa, J. K. (1994). Control of Arabidopsis Flower and Seed Development by the Homeotic Gene APETALA2. *The Plant Cell*, 6, 1211–1225.
- Jofuku, K. D., Omidyar, P. K., Gee, Z., Okamuro, J. K. (2005). Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene APETALA2. *PNAS*, 102(8), 3117–3122.
- Jung, J. H., Lee, H. J., Ryu, J. Y., Park, C. M. (2016). SPL3/4/5 Integrate Developmental Aging and Photoperiodic Signals into the FT-FD Module in Arabidopsis Flowering. *Molecular Plant*, 9(12), 1647–1659.
- Kelly, M., Davies, P. J. (1988). Photoperiodic and Genetic Control of Carbon Partitioning in Peas and Its Relationship to Apical Senescence1. *Plant Physiol*, 86, 978–982.
- Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T., Davies, B. (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell*, 18(3), 560–573.
- Kim, H. J., Chiang, Y. H., Kieber, J. J., Schaller, G. E. (2013). SCFKMD controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *PNAs*, 110(24), 10028–10033.
- Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P., Ahn, J. H. (2012). The microrna156-SQUAMOSA promoter binding protein-like3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via flowering locus in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 159(1), 461–478.
- Koncz CaS, J. (1986) The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics* 204:383-396.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *PNAS*, 107(5), 2361–2366.
- Laux, T., Mayer, K. F. X., Berger, J., Jürgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development*, 122, 87–96.
- Lenhard, M., Jürgens, G., Laux, T. (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development*, 129, 3195–3206.
- Leonelli, S. (2007). Arabidopsis, the botanical Drosophila: from mouse cress to model organism. In *Endeavour* (Vol. 31, Issue 1, pp. 34–38).
- Leopold, A. C., Niedergang-Kamien, E., Janick, J. (1959). Experimental modification of plant senescence. *Plant Physiology*, 34, 570–573.

- Li, X., Zhang, G., Liang, Y., Hu, L., Zhu, B., Qi, D., Cui, S., Zhao, H. (2021). TCP7 interacts with Nuclear Factor-Ys to promote flowering by directly regulating SOC1 in Arabidopsis. *Plant Journal*, 108(5), 1493–1506.
- Lockhart, J. A., Gottschall, V. (1961). Fruit-induced apical senescence in *Pisum sativum* L. *Plant Physiology*, 36, 389–398.
- Maere, S., Heymans, K., Kuiper, M. (2005). BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*, 21(16), 3448–3449.
- Mandel, M. A., Yanofsky, M. F. (1995). The Arabidopsis AGL8 MADS Box Gene 1s Expressed in Inflorescence Meristems and 1s Negatively Regulated by APETALA1. *The Plant Cell*, 7, 1763–1771.
- Martínez-Fernández, I. (2017) La ruta FUL-AP2 y la longevidad de los meristemos en *Arabidopsis thaliana*. Bases moleculares y potencial biotecnológico. Tesis doctoral. *Universidad Politécnica de Valencia*.
- Martínez-Fernández, I., de Moura, S. M., Alves-Ferreira, M., Ferrándiz, C., Balanzà, V. (2020). Identification of players controlling meristem arrest downstream of the FRUITFULL-APETALA2 pathway. *Plant Physiology*, 184(2), 945–959.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., & Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biology*, 7(7).
- Mayer, K. F. X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., Lauz, T. (1998). Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Cell*, 805–815.
- McCarthy, E. W., Mohamed, A., Litt, A. (2015). Functional divergence of APETALA1 and FRUITFULL is due to changes in both regulation and coding sequence. *Frontiers in Plant Science*, 6(1076).
- Meng, W. J., Cheng, Z. J., Sang, Y. L., Zhang, M. M., Rong, X. F., Wang, Z. W., Tang, Y. Y., Zhang, X. S. (2017). Type-B ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS specify the shoot stem cell niche by dual regulation of WUSCHEL. *Plant Cell*, 29(6), 1357–1372.
- Merele, P., González-Cuadra, I., Ferrándiz, C. (2022). A cellular analysis of meristem activity at the end of flowering points to cytokinin as a major regulator of proliferative arrest in Arabidopsis. *Current Biology*, 32, 749–762.
- Müller R, Bleckmann A, Simon R (2008) The Receptor Kinase CORYNE of Arabidopsis Transmits the Stem Cell-Limiting Signal CLAVATA3 Independently of CLAVATA1. *The Plant Cell* 20: 934–946
- Murneek, A. E. (1926). Effects of correlation between vegetative and reproductive functions in the tomato (*Lycopersicon esculentum* mill). *Plant Physiology*, 3, 1–57.
- Murneek, A. E. (1932). Growth and development as influenced by fruit and seed formation. *Plant Physiology*, 7, 79–90.
- Musialak-Lange, M., Fiddeke, K., Franke, A., Kragler, F., Abel, C., Wahl, V., & Contributed Equally, A. F. (2021). Sugar Signaling Induces Dynamic Changes During Meristem Development to Regulate Flowering in Arabidopsis. *BioRxiv*
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., Tran, L. S. P. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*, 23(6), 2169–2183.
- Niwa, M., Daimon, Y., Kurotani, K. I., Higo, A., Pruneda-Paz, J. L., Breton, G., Mitsuda, N., Kay, S. A., Ohme-Takagi, M., Endo, M., & Araki, T. (2013). BRANCHED1 interacts with FLOWERING LOCUS T to repress the floral transition of the axillary meristems in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(4), 1228–1242.

- Noodén, L. D., Penney, J. P. (2001). Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany*, 52(364), 2151–2159.
- O'Malley, R. C., Huang, S. S. C., Song, L., Lewsey, M. G., Bartlett, A., Nery, J. R., Galli, M., Gallavotti, A., & Ecker, J. R. (2016). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell*, 165(5), 1280–1292.
- Ó'Maoiléidigh, D. S., van Driel, A. D., Singh, A., Sang, Q., Le Bec, N., Vincent, C., de Olalla, E. B. G., Vayssières, A., Branchat, M. R., Severing, E., Gallegos, R. M., Coupland, G. (2021). Systematic analyses of the MIR172 family members of *Arabidopsis* define their distinct roles in regulation of APETALA2 during floral transition. *PLoS Biology*, 19(2).
- Pelletier, M. K., Murrell, J. R., Shirley, B. W. (1997). Characterization of Flavonol Synthase and Leucoanthocyanidin Dioxygenase Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 113, 1437–1445.
- Perotti, M. F., Ribone, P. A., Chan, R. L. (2017). Plant transcription factors from the homeodomain-leucine zipper family I. Role in development and stress responses. In *IUBMB Life* (Vol. 69, Issue 5, pp. 280–289). Blackwell Publishing Ltd.
- Preston, J. C., Hileman, L. C. (2013). Functional evolution in the plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) gene family. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 4, Issue 80, pp. 1–13). Frontiers Research Foundation.
- Proebsting, W. M., Davies, P. J., Marx, G. A. (1977). Evidence for a Graft-transmissible Substance which Delays Apical Senescence in *Pisum sativum* L. *Planta*, 135, 93–94.
- Pruneda-Paz, J. L., Breton, G., Para, A., Kay, S. A. (2009). A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*, 323(5920), 1481–1485.
- Reddy, S. K., Holalu, S. V., Casal, J. J., Finlayson, S. A. (2013). Abscisic acid regulates axillary bud outgrowth responses to the ratio of red to far-red light. *Plant Physiology*, 163(2), 1047–1058.
- Reid, J. B. (1980). Apical Senescence in *Pisum*: A Direct or Indirect Role for the Flowering Genes? *Ann. Bot.*, 45, 195–201.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., Bartel, D. P. (2002). Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell*, 110, 513–520.
- Roodbarkelari, F., Groot, E. P. (2017). Regulatory function of homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP) family proteins during embryogenesis. In *New Phytologist* (Vol. 213, Issue 1, pp. 95–104). Blackwell Publishing Ltd.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sánchez-Matilla, J. (2022) Caracterización de FLOWERING LOCUS T (FT) y otros integradores de la transición floral como elementos reguladores del final de la floración. Trabajo de fin de máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juárez P, Fernández-del-Carmen A, Granell A, et al. (2011) GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PLoS ONE* 6(7): e21622.
- Sato, H., Takasaki, H., Takahashi, F., Suzuki, T., Iuchi, S., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., Ikeda, M., Seo, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2018). *Arabidopsis thaliana* NGATHA1 transcription factor induces ABA biosynthesis by activating NCED3 gene during dehydration stress. *PNAS*, 115(47), E11178–E11187.
- Schaller, G. E., Street, I. H., Kieber, J. J. (2014). Cytokinin and the cell cycle. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 21, pp. 7–15). Elsevier Ltd.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*, 37(5), 501–506.

- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jürgens, G., Laux, T. (2000). The Stem Cell Population of Arabidopsis Shoot Meristems Is Maintained by a Regulatory Loop between the CLAVATA and WUSCHEL Genes. *Cell*, 635–644.
- Schulten, A., Bytomski, L., Quintana, J., Bernal, M., Krämer, U. (2019). Do Arabidopsis Squamosa promoter binding Protein-Like genes act together in plant acclimation to copper or zinc deficiency? . *Plant Direct*, 3, 1–14.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Rieger, M., Schommer, C., Schmid, M., Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8(4), 517–527.
- Sessions, A., Weigel, D., Yanofsky, M. F. (1999). The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal*, 20(2), 259–263.
- Shannon, S., Meeks-Wagner, D.R. (1991). A Mutation in the Arabidopsis TFL1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development. *The Plant Cell*, 3, 877–892.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504.
- Shutian, L. (2015). The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development. *Plant Signaling and Behavior*, 10(7), e1044192-1-e1044192-12.
- Sinclair T R, De Wit C T. (1975). Photosynthate and Nitrogen Requirements for Seed Production by Various Crops. *Science*, 189, 565–567.
- Sreenivasulu, N., Harshavardhan, V. T., Govind, G., Seiler, C., Kohli, A. (2012). Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? In *Gene* (Vol. 506, Issue 2, pp. 265–273).
- Srikanth, A., & Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 12, pp. 2013–2037).
- Stone, J. M., Liang, X., Neel, E. R., Stiers, J. J. (2005). Arabidopsis AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant Journal*, 41(5), 744–754.
- Su, Z., Ma, X., Guo, H., Sukiran, N. L., Guo, B., Assmann, S. M., Ma, H. (2013). Flower development under drought stress: Morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(10), 3785–3807.
- Tan, B. C., Joseph, L. M., Deng, W. T., Liu, L., Li, Q. B., Cline, K., McCarty, D. R. (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant Journal*, 35(1), 44–56.
- Tang, Y., Bao, X., Wang, S., Liu, Y., Tan, J., Yang, M., Zhang, M., Dai, R., Yu, X. (2019). A physic nut stress-responsive HD-Zip transcription factor, JcHDZ07, confers enhanced sensitivity to salinity stress in transgenic arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 10(942).
- Tripathi, R. K., Bregitzer, P., Singh, J. (2018). Genome-wide analysis of the SPL/miR156 module and its interaction with the AP2/miR172 unit in barley. *Scientific Reports*, 8(7085).
- Vaseva, I., Todorova, D., Malbeck, J., Trávníčková, A., Macháčková, I. (2008). Response of cytokinin pool and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity to abscisic acid exhibits organ specificity in peas. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(2), 151–155.
- Walker, C. H., Ware, A., Simura, J., Ljung, K., Wilson, Z., Bennett, T. (2023). Cytokinin signaling regulates two-stage inflorescence arrest in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 191(1), 479–495.
- Wang, H., Wang, H. (2015a). The miR156/SPL module, a regulatory hub and versatile toolbox, gears up crops for enhanced agronomic traits. In *Molecular Plant* (Vol. 8, Issue 5, pp. 677–688). Cell Press.

- Wang, J. W., Czech, B., Weigel, D. (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138(4), 738–749.
- Wang, J. W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E., Weigel, D. (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 20(5), 1231–1243.
- Wang, S., Wu, K., Qian, Q., Liu, Q., Li, Q., Pan, Y., Ye, Y., Liu, X., Wang, J., Zhang, J., Li, S., Wu, Y., Fu, X. (2017). Non-canonical regulation of SPL transcription factors by a human OTUB1-like deubiquitinase defines a new plant type rice associated with higher grain yield. *Cell Research*, 27(9), 1142–1156.
- Wang, Y., Kumaishi, K., Suzuki, T., Ichihashi, Y., Yamaguchi, N., Shirakawa, M., Ito, T. (2020). Morphological and Physiological Framework Underlying Plant Longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 11(600726).
- Wang, Z. P., Xing, H. L., Dong, L., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Wang, X. C., Chen, Q. J. (2015b). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biology*, 16(144).
- Ware, A., Walker, C. H., Šimura, J., González-Suárez, P., Ljung, K., Bishopp, A., Wilson, Z. A., Bennett, T. (2020). Auxin export from proximal fruits drives arrest in temporally competent inflorescences. *Nature Plants*, 6(6), 699–707.
- Weigel D, Glazebrook, J. (2002) *Arabidopsis: A laboratory manual*.
- Willmann, M. R. (2000). CLV1 and CLV3: negative regulators of SAM stem cell accumulation. *Elsevier Science Ltt*, 5(10), 1360–1385.
- Wilson, J. B. (1997). An evolutionary perspective on the Meath hormone' hypothesis in plants. *Physiologia Plantarum*, 99, 511–516.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138(4), 750–759.
- Wu, G., Poethig, R. S. (2006). Temporal Regulation of Shoot Development in *Arabidopsis Thaliana* By Mir156 and Its Target SPL3. *Development*, 133(18), 3539–3547.
- Wuest, S. E., Philipp, M. A., Guthörl, D., Schmid, B., Grossniklaus, U. (2016). Seed production affects maternal growth and senescence in *arabidopsis*. *Plant Physiology*, 171(1), 392–404.
- Würschum, T., Groß-Hardt, R., Laux, T. (2006). APETALA2 regulates the stem cell niche in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell*, 18(2), 295–307.
- Xing, S., Salinas, M., Höhmann, S., Berndtgen, R., & Huijser, P. (2010). miR156-targeted and nontargeted SBP-Box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22(12), 3935–3950.
- Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M. Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L., Poethig, R. S. (2016). Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 12(8).
- Yadav, R. K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., Reddy, G. V. (2009). Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *PNAS March*, 106(12), 4941–4946.
- Yamaguchi, A., Wu, M. F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S., Wagner, D. (2009). The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor SPL3 Is a Direct Upstream Activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Developmental Cell*, 17(2), 268–278.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Nunokawa, E., Ishizuka, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., Yokoyama, S. (2004). A Novel Zinc-binding Motif Revealed by Solution Structures of DNA-binding Domains of *Arabidopsis* SBP-family Transcription Factors. *Journal of Molecular Biology*, 337(1), 49–63.

-
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., Schmid, M.** (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. *Plant Cell*, *22*(7), 2156–2170.
- Yao, C., Finlayson, S. A.** (2015). Abscisic acid is a general negative regulator of arabidopsis axillary bud growth. *Plant Physiology*, *169*(1), 611–626.
- Yu, N., Cai, W. J., Wang, S., Shan, C. M., Wang, L. J., Chena, X. Y.** (2010). Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, *22*(7), 2322–2335.
- Zang, Y., Gong, Y., Wang, Q., Guo, H., Xiao, W.** (2020). Arabidopsis OTU1, a linkage-specific deubiquitinase, is required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Plant Journal*, *101*(1), 141–155.
- Zhang, L., Wu, B., Zhao, D., Li, C., Shao, F., & Lu, S.** (2014). Genome-wide analysis and molecular dissection of the SPL gene family in *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *56*(1), 38–50.

A decorative watercolor splash in shades of blue, orange, and green is positioned in the lower right quadrant of the page. The word "ANEXOS" is printed in white, uppercase letters over the center of this splash.

ANEXOS

ANEXO I. Secuencia de aminoácidos predicha de las proteínas FUL y FUL-cr**FUL:**

MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRSGLLKAHEISVLCDAEVALIVFSSKGKLFYSTDSCME
RILERYDRYLYSDKQLVGRDVSQSENWVLEHAKLKARVEVLEKNKRNFMGEDLDSLSELKELQS
LEHQLDAAIKSIRSRKNQAMFESISALQKKDKALQDHNSLLKKIKEREKKTGQQEGQLVQCS
NSSSVLLPQYCVTSSRDGFVERVGGENGASSLTEPNSLLPAWMLRPTTTNE.

FUL-CRISPR:

MERILERYDRYLYSDKQLVGRDVSQSENWVLEHAKLKARVEVLEKNKRNFMGEDLDSLSELKEL
QSLEHQLDAAIKSIRSRKNQAMFESISALQKKDKALQDHNSLLKKIKEREKKTGQQEGQLVQ
CSNSSSVLLPQYCVTSSRDGFVERVGGENGASSLTEPNSLLPAWMLRPTTTNE.

En amarillo se muestra la región conservada tras el CRISPR.

ANEXO II. Categorías GO de los DEGs activados y reprimidos en <i>spl-quad</i> vs Col-0 3sda		
ID GO	Descripción GO	Genes
ACTIVADOS		
9719	Respuesta a estímulo endógeno	AT5G18020 AT3G22060 AT5G24780 AT4G23600 AT5G54510 AT1G29395 AT4G26150 AT5G59845 AT1G71960 AT5G60360 AT3G59220 AT2G18420 AT4G27440 AT1G74430 AT1G72450 AT3G60690 AT1G74950 AT2G46370 AT3G50970 AT2G46690 AT1G08920 AT4G17870 AT4G16780 AT2G40670 AT4G27410 AT5G19140 AT2G46070 AT5G24770 AT5G67300 AT4G08950 AT4G22880 AT2G32460 AT5G07010 AT5G53590 AT1G72260 AT1G17380 AT4G37050 AT1G70000 AT2G44080 AT2G33880 AT2G35940 AT3G23050 AT5G52830 AT5G66400 AT4G27260 AT5G66880 AT4G25000 AT1G18710 AT5G14920 AT1G22690 AT2G21210 AT2G23430 AT3G16470 AT4G37260 AT1G25560 AT1G72430 AT2G26740 AT5G13380 AT5G59780 AT4G30270 AT4G34750 AT4G36410 AT3G15500 AT3G27920 AT1G29460 AT5G15960 AT5G67480 AT1G70700 AT2G34340 AT1G71030 AT4G38840 AT1G72360 AT3G13890 AT1G20440 AT3G45140 AT4G34760 AT2G46680 AT4G36740 AT1G08810 AT4G35770
10033	Respuesta a sustancia orgánica	AT5G18020 AT3G22060 AT5G49520 AT5G24780 AT4G23600 AT5G54510 AT1G29395 AT4G26150 AT5G59845 AT1G71960 AT5G60360 AT3G59220 AT2G18420 AT4G27440 AT1G74430 AT1G72450 AT3G60690 AT1G74950 AT1G28330 AT2G46370 AT3G50970 AT2G46690 AT1G08920 AT4G17870 AT4G16780 AT2G40670 AT4G27410 AT5G19140 AT2G46070 AT5G24770 AT5G67300 AT4G08950 AT4G22880 AT2G32460 AT4G33050 AT5G07010 AT5G53590 AT1G72260 AT1G17380 AT5G56860 AT4G37050 AT1G70000 AT2G44080 AT1G75490 AT5G10380 AT3G47340 AT1G34180 AT4G11360 AT2G33880 AT2G35940 AT3G23050 AT5G52830 AT5G66400 AT4G27260 AT3G62410 AT5G66880 AT4G25000 AT1G18710 AT5G14920 AT1G22690 AT2G21210 AT4G35480 AT2G23430 AT3G16470 AT4G37260 AT1G25560 AT5G59820 AT1G72430 AT2G26740 AT5G13380 AT5G59780 AT4G30270 AT4G34750 AT4G36410 AT3G15500 AT3G27920 AT1G29460 AT5G15960 AT5G67480 AT1G70700 AT2G34340 AT1G71030 AT4G38840 AT1G72360 AT3G13890 AT1G20440 AT3G45140 AT4G34760 AT2G46680 AT4G36740 AT1G08810 AT4G35770
50896	Respuesta a estímulo	AT5G50950 AT3G22060 AT5G24780 AT5G54510 AT1G71960 AT5G14740 AT3G59220 AT1G55920 AT1G52400 AT1G74430 AT3G60690 AT4G10960 AT1G08920 AT2G26560 AT4G04955 AT5G49730 AT2G46070 AT5G24770 AT1G68320 AT4G21870 AT2G32460 AT4G33050 AT4G39950 AT1G72260 AT5G53550 AT5G10380 AT4G19520 AT3G47340 AT1G60960 AT2G29940 AT1G78000 AT4G11360 AT2G33880 AT2G35940 AT3G23050 AT1G59740 AT1G30040 AT5G66400 AT1G70410 AT3G58350 AT5G27350 AT5G66880 AT1G18710 AT2G21210 AT2G41380 AT4G35480 AT2G18050 AT2G24040 AT1G51090 AT5G59780 AT1G32450 AT3G02480 AT3G20340 AT1G08810 AT1G35310 AT5G49520 AT3G51660 AT4G23600 AT3G17070 AT1G65480 AT5G65210 AT1G64030 AT1G72450 AT2G01500 AT5G06870 AT1G28330 AT1G80760 AT5G52250 AT5G57380 AT2G40670 AT4G27410 AT5G19140 AT3G49110 AT5G20250 AT3G27660 AT4G08950 AT4G22880 AT5G53590 AT5G56860 AT1G69850 AT4G19840 AT1G20620 AT4G24275 AT5G40170 AT5G22300 AT4G39090 AT5G52830 AT3G62410 AT3G01500 AT5G47240 AT4G25000 AT5G14920 AT4G21680 AT5G46270 AT1G22690 AT1G02400 AT1G73680 AT2G23430 AT1G77920 AT3G12750 AT3G11660 AT5G13380 AT4G30270 AT4G34750 AT4G39640 AT2G29090 AT1G11210 AT1G71030 AT1G52410 AT1G72360 AT3G45780 AT4G34760 AT2G43010 AT1G12110 AT5G18020 AT5G24380 AT5G60360 AT2G18420 AT4G27440 AT1G13830 AT1G74950 AT5G38420 AT1G19670 AT5G58390 AT1G05010 AT2G02990 AT5G04530 AT2G46690 AT4G17870 AT4G16780 AT5G44680 AT5G50200 AT3G56240 AT5G67300 AT4G20260 AT5G07010 AT1G23010 AT1G17380 AT4G36040 AT1G70000 AT3G16340 AT5G38410 AT1G75490 AT1G34000 AT5G26660 AT5G61590 AT2G36750 AT5G56550 AT5G39610 AT1G01470 AT2G44490 AT3G16470 AT4G37260 AT4G13810 AT5G59820 AT1G72430 AT1G75380 AT2G26740 AT3G08860 AT3G27920 AT1G29460 AT1G70700 AT2G34340 AT3G13890 AT1G19660 AT3G10020 AT2G27140 AT2G46680 AT4G36740 AT3G15950 AT4G35770 AT3G30775 AT2G40460 AT4G31500 AT5G14780 AT1G29395 AT3G60530 AT4G26150 AT5G59845 AT2G19310 AT2G41480 AT1G52040 AT2G46370 AT3G50970 AT1G80920 AT3G25760 AT4G37050 AT5G38850 AT2G44080 AT2G45170 AT1G47128 AT5G02200 AT1G34180 AT3G11930 AT4G27260 AT1G16850 AT2G15890 AT5G61270 AT4G37980 AT1G70690 AT5G57685 AT1G25560 AT4G33020 AT4G36410 AT3G15500 AT2G43535 AT3G25780 AT5G15960 AT5G67480 AT1G66090 AT4G38840 AT1G25450 AT1G20440 AT3G45140 AT2G43530 AT3G17810
42221	Respuesta a estímulo químico	AT1G12110 AT5G18020 AT3G22060 AT5G24780 AT5G54510 AT5G24380 AT1G71960 AT5G60360 AT3G59220 AT2G18420 AT4G27440 AT1G52400 AT1G74430 AT3G60690 AT1G74950 AT5G58390 AT2G46690 AT1G08920 AT4G17870 AT4G16780 AT2G26560 AT5G50200 AT2G46070 AT5G24770 AT1G68320 AT3G56240 AT5G67300 AT2G32460 AT4G33050 AT5G07010 AT1G717380 AT1G70000 AT3G16340 AT1G75490 AT5G10380 AT3G47340 AT2G29940 AT4G11360 AT2G33880 AT2G35940 AT3G23050 AT5G66400 AT1G70410 AT5G61590 AT5G66880 AT1G18710 AT2G21210 AT2G41380 AT4G35480 AT2G18050 AT5G56550 AT5G39610 AT1G01470 AT3G16470 AT4G37260 AT5G59820 AT1G72430 AT2G26740 AT5G59780 AT1G32450 AT3G02480 AT3G27920 AT1G29460 AT1G70700 AT2G34340 AT3G20340 AT3G13890 AT3G10020 AT2G46680 AT4G36740 AT1G08810 AT4G35770 AT3G30775 AT5G49520 AT5G14780 AT4G23600 AT1G29395 AT3G17070 AT4G26150 AT5G59845 AT2G19310 AT2G41480 AT1G72450 AT1G28330 AT1G80760 AT2G46370 AT3G50970 AT5G57380 AT2G40670 AT4G27410 AT5G19140 AT3G25760 AT4G08950 AT4G22880 AT5G53590 AT5G56860 AT4G37050 AT2G44080 AT1G47128 AT1G34180 AT1G20620 AT5G22300 AT4G39090 AT5G52830 AT4G27260 AT3G62410 AT3G01500 AT4G25000 AT5G14920 AT4G21680 AT1G22690 AT2G23430 AT1G25560 AT3G12750 AT5G13380 AT4G30270 AT4G34750 AT4G33020 AT4G36410 AT4G39640 AT3G15500 AT5G15960 AT1G11210 AT5G67480 AT1G71030 AT4G38840 AT1G72360 AT1G20440 AT3G45140 AT4G34760

9753	Respuesta a ácido jasmónico	AT3G23050 AT5G24780 AT5G24770 AT4G23600 AT5G67300 AT4G22880 AT1G70700 AT1G18710 AT5G07010 AT1G74430 AT1G71030 AT1G72450 AT1G72260 AT1G17380 AT3G16470 AT4G37260 AT1G74950 AT1G70000 AT2G46370 AT3G45140 AT5G59780 AT1G08810 AT4G35770 AT3G15500
19915	Almacenamiento de lípidos	AT5G07560 AT5G56100 AT5G07520 AT5G07530 AT3G27660 AT5G51210 AT5G07550 AT5G07510
6857	Transporte de oligopéptidos	AT1G32450 AT1G59740 AT5G62680 AT5G55930 AT3G21670 AT5G53510 AT5G24380 AT3G54140 AT1G68570 AT4G21680 AT1G72130 AT5G28470 AT1G22550 AT5G53550 AT2G40460
15833	Transporte de péptidos	AT1G32450 AT1G59740 AT5G62680 AT5G55930 AT3G21670 AT5G53510 AT5G24380 AT3G54140 AT1G68570 AT4G21680 AT1G72130 AT5G28470 AT1G22550 AT5G53550 AT2G40460
15976	Utilización del carbono	AT1G70410 AT3G01500 AT5G14740 AT1G58180 AT1G23730
9725	Respuesta a hormona	AT5G18020 AT3G22060 AT4G23600 AT5G54510 AT1G29395 AT4G26150 AT5G59845 AT1G71960 AT5G60360 AT3G59220 AT2G18420 AT4G27440 AT3G60690 AT2G46370 AT3G50970 AT2G46690 AT1G08920 AT4G17870 AT4G16780 AT2G40670 AT4G27410 AT5G19140 AT2G46070 AT5G67300 AT4G08950 AT2G32460 AT5G53590 AT4G37050 AT1G70000 AT2G44080 AT2G33880 AT2G35940 AT3G23050 AT5G52830 AT5G66400 AT4G27260 AT5G66880 AT4G25000 AT5G14920 AT1G22690 AT2G21210 AT2G23430 AT4G37260 AT1G25560 AT1G72430 AT2G26740 AT5G13380 AT5G59780 AT4G30270 AT4G34750 AT4G36410 AT3G27920 AT1G29460 AT5G15960 AT5G67480 AT2G34340 AT1G71030 AT4G38840 AT1G72360 AT3G13890 AT1G20440 AT4G34760 AT2G46680 AT4G36740 AT1G08810
9739	Respuesta a giberelinas	AT5G52830 AT3G27920 AT5G59845 AT5G67300 AT5G66880 AT2G18420 AT5G67480 AT4G25000 AT5G14920 AT2G34340 AT2G32460 AT1G22690 AT1G71030 AT3G13890 AT1G70000 AT5G59780 AT4G30270 AT4G36410
9718	Proceso de biosíntesis de antocianinas	AT1G71030 AT1G78600 AT2G02990 AT3G29590 AT5G42800 AT4G22880
9414	Respuesta a privación de agua	AT1G12110 AT4G27410 AT3G23050 AT4G39090 AT3G25760 AT3G02480 AT5G66400 AT1G29395 AT5G61590 AT5G67300 AT5G15960 AT5G66880 AT1G52400 AT2G18050 AT1G01470 AT1G47128 AT1G20440 AT3G50970 AT2G26740 AT3G45140 AT2G46680 AT1G08920 AT1G08810 AT3G15500
10876	Localización de lípidos	AT1G55260 AT3G51590 AT1G36150 AT3G27660 AT5G51210 AT4G14815 AT4G08670 AT2G37870 AT5G07230 AT5G07560 AT5G56100 AT1G18280 AT5G07520 AT5G07530 AT2G44290 AT5G07550 AT2G45180 AT4G33355 AT5G01870 AT5G07510 AT1G12090
9415	Respuesta a agua	AT1G12110 AT4G27410 AT3G23050 AT4G39090 AT3G25760 AT3G02480 AT5G66400 AT1G29395 AT5G61590 AT5G67300 AT5G15960 AT5G66880 AT1G52400 AT2G18050 AT1G01470 AT1G47128 AT1G20440 AT3G50970 AT2G26740 AT3G45140 AT2G46680 AT1G08920 AT1G08810 AT3G15500
46283	Proceso metabólico de antocianinas	AT1G71030 AT1G78600 AT2G02990 AT3G29590 AT5G42800 AT4G22880
9611	Respuesta a herida	AT3G23050 AT5G50200 AT5G24770 AT5G14780 AT3G51660 AT4G23600 AT5G47240 AT4G22880 AT1G72450 AT1G01470 AT3G16470 AT1G74950 AT1G19660 AT5G59820 AT2G02990 AT2G46370 AT3G45140 AT4G35770
48646	Formación de estructura anatómica relacionada en la morfogénesis	AT1G14520 AT2G26170 AT3G55500 AT5G40260 AT2G40610 AT3G50330 AT2G19800 AT4G26260 AT5G22260 AT5G09750 AT2G23430 AT1G24260 AT2G19070 AT1G01280 AT3G11980
6950	Respuesta a estrés	AT1G12110 AT5G50950 AT5G24780 AT5G14740 AT1G55920 AT1G52400 AT4G13830 AT1G74950 AT4G10960 AT1G19670 AT5G58390 AT2G02990 AT5G04530 AT1G08920 AT2G26560 AT5G44680 AT4G04955 AT5G50200 AT5G24770 AT1G68320 AT4G21870 AT3G56240 AT5G67300 AT4G20260 AT4G39950 AT1G23010 AT1G72260 AT4G36040 AT1G70000 AT4G19520 AT3G47340 AT1G78000 AT3G23050 AT5G66400 AT5G61590 AT5G66880 AT1G18710 AT2G18050 AT5G56550 AT5G39610 AT1G01470 AT2G44490 AT3G16470 AT4G13810 AT5G59820 AT1G75380 AT2G24040 AT2G26740 AT1G51090 AT3G02480 AT3G20340 AT1G19660 AT3G10020 AT2G27140 AT2G46680 AT1G08810 AT3G15950 AT4G35770 AT3G30775 AT1G35310 AT4G31500 AT5G49520 AT5G14780 AT3G51660 AT4G23600 AT1G29395 AT3G17070 AT5G65210 AT1G64030 AT2G19310 AT2G41480 AT1G72450 AT2G01500 AT5G06870 AT1G52040 AT2G46370 AT3G50970 AT5G57380 AT1G08920 AT4G27410 AT3G49110 AT3G25760 AT5G20250 AT3G27660 AT4G22880 AT5G38850 AT2G45170 AT1G47128 AT3G11930 AT1G20620 AT4G24275 AT5G40170 AT5G22300 AT4G39090 AT5G52830 AT3G01500 AT5G47240 AT1G16850 AT2G15890 AT5G46270 AT4G37980 AT1G70690 AT1G77920 AT3G11660 AT4G39640 AT3G15500 AT2G43535 AT3G25780 AT5G15960 AT1G11210 AT1G71030 AT1G66090 AT4G38840 AT1G52410 AT1G72360 AT1G25450 AT1G20440 AT3G45140 AT2G43530
9631	Aclimatación al frío	AT5G59820 AT5G66400 AT1G29395 AT1G20440 AT3G50970 AT5G15960
51179	Localización	AT1G12110 AT3G25690 AT2G26170 AT5G43340 AT4G18050 AT3G28960 AT1G15460 AT3G55540 AT1G23090 AT5G24380 AT1G30220 AT2G19110 AT1G10970 AT1G05810 AT1G72130 AT1G22550 AT5G07520 AT1G44100 AT1G22710 AT1G08920 AT3G51590 AT5G50200 AT1G36150 AT5G14570 AT3G56240 AT2G37870 AT4G39950 AT4G15200 AT5G53550 AT5G07530 AT3G16340 AT1G60960 AT2G29940 AT1G78000 AT1G12090 AT5G57350 AT1G55260 AT1G07340 AT1G59740 AT5G62680 AT3G21670 AT4G05110 AT1G68570 AT5G47560 AT1G72150 AT1G18280 AT2G44490 AT1G28230 AT2G45180 AT1G22530 AT1G32450 AT5G40780 AT5G66110 AT5G46240 AT5G07230 AT4G33355 AT5G07510 AT1G05300 AT2G40460 AT4G31500 AT3G46900 AT2G31040 AT5G07560 AT4G11730 AT1G80760 AT5G59040 AT5G23810 AT1G65800 AT1G57990 AT1G64200 AT3G27660 AT5G51210 AT4G28580 AT5G55930 AT5G53510 AT3G54140 AT4G08670 AT3G19930 AT5G56100 AT5G02200 AT5G01870 AT5G02600 AT4G18190 AT3G20660 AT4G21680 AT1G02520 AT1G08900 AT5G57680 AT2G44290 AT3G12750 AT2G47160 AT4G33020 AT1G61630 AT5G17860 AT4G14815 AT5G28470 AT3G61450 AT5G07550 AT3G45780 AT1G24400 AT1G22740

6949	Formación del sincitio	AT1G14520 AT3G55500 AT2G40610 AT2G19800 AT4G26260
9628	Respuesta a estímulo abiótico	AT1G12110 AT5G50950 AT4G31500 AT4G23600 AT1G29395 AT3G60530 AT4G26150 AT1G65480 AT3G59220 AT2G19310 AT1G55920 AT1G52400 AT2G01500 AT5G38420 AT2G46370 AT3G50970 AT5G04530 AT5G52250 AT1G08920 AT5G57380 AT4G16780 AT4G27410 AT3G49110 AT3G25760 AT5G49730 AT5G20250 AT5G24770 AT3G27660 AT4G21870 AT3G56240 AT5G67300 AT4G20260 AT5G56860 AT1G70000 AT5G38410 AT1G47128 AT3G47340 AT5G02200 AT1G20620 AT2G35940 AT3G23050 AT4G39090 AT1G34000 AT1G30040 AT5G66400 AT5G26660 AT5G61590 AT3G62410 AT3G01500 AT5G66880 AT2G36750 AT1G16850 AT5G61270 AT1G18710 AT1G02400 AT2G18050 AT5G39610 AT1G01470 AT3G16470 AT1G25560 AT5G59820 AT2G24040 AT2G26740 AT3G15500 AT2G29090 AT3G02480 AT3G25780 AT5G15960 AT1G71030 AT4G38840 AT1G25450 AT3G45780 AT1G20440 AT3G45140 AT2G27140 AT2G46680 AT1G08810 AT3G15950 AT2G43010
51704	Proceso multi-organismo	AT5G14380 AT4G31500 AT5G49520 AT3G51660 AT5G65210 AT5G14740 AT1G52400 AT1G05010 AT2G46370 AT3G50970 AT2G26560 AT3G49110 AT5G24770 AT4G20260 AT4G39950 AT4G15200 AT5G53550 AT5G07530 AT1G69850 AT4G19840 AT1G60960 AT4G27300 AT2G35940 AT4G39090 AT2G35300 AT5G52830 AT1G59740 AT3G58350 AT3G01500 AT5G22260 AT5G27350 AT2G15890 AT4G37980 AT1G70690 AT1G72150 AT1G73680 AT1G77920 AT1G01470 AT2G44490 AT5G57685 AT1G05010 AT1G75380 AT2G46370 AT2G35070 AT1G75380 AT3G11660 AT1G51090 AT3G07130 AT3G25780 AT5G28470 AT1G52410 AT1G25450 AT1G20440 AT3G45140 AT2G40460
46713	Transporte del boro	AT1G15460 AT1G80760 AT2G47160
19953	Reproducción sexual	AT5G07560 AT1G75930 AT5G07520 AT1G75890 AT5G07530 AT1G75880 AT5G07550 AT5G07510 AT1G75920 AT1G75910
16137	Proceso metabólico de glucósidos	AT1G62540 AT4G22590 AT5G10100 AT4G24040 AT2G44490 AT4G31500 AT2G36190 AT2G25450 AT4G02280 AT5G37180 AT1G35910 AT1G70290
51707	Respuesta a otros organismos	AT2G35940 AT4G39090 AT5G52830 AT4G31500 AT5G49520 AT1G59740 AT3G51660 AT3G58350 AT3G01500 AT5G65210 AT5G14740 AT5G27350 AT2G15890 AT1G52400 AT4G37980 AT1G70690 AT1G73680 AT1G77920 AT1G01470 AT2G44490 AT5G57685 AT1G05010 AT1G75380 AT2G46370 AT3G50970 AT3G11660 AT1G51090 AT2G26560 AT3G49110 AT5G24770 AT3G25780 AT4G20260 AT4G39950 AT1G52410 AT5G53550 AT1G69850 AT1G20440 AT4G19840 AT1G60960 AT3G45140 AT2G40460
15706	Transporte de nitrato	AT1G12110 AT5G50200 AT1G32450 AT5G14570
9311	Proceso metabólico de oligosacáridos	AT4G22590 AT5G10100 AT1G24320 AT4G24040 AT2G36190 AT4G02280 AT5G37180 AT1G35910 AT1G70290
9607	Respuesta a estímulo biótico	AT2G35940 AT4G39090 AT1G35310 AT5G52830 AT4G31500 AT5G49520 AT1G59740 AT3G51660 AT3G58350 AT3G01500 AT5G65210 AT5G14740 AT5G27350 AT2G15890 AT1G52400 AT4G37980 AT1G70690 AT1G73680 AT1G77920 AT1G01470 AT2G44490 AT5G57685 AT1G05010 AT1G75380 AT2G46370 AT3G50970 AT3G11660 AT1G51090 AT2G26560 AT3G49110 AT5G24770 AT3G25780 AT4G20260 AT4G39950 AT1G52410 AT5G53550 AT1G69850 AT1G20440 AT4G19840 AT1G60960 AT3G45140 AT2G40460
5984	Proceso metabólico de disacáridos	AT4G22590 AT5G10100 AT4G24040 AT2G36190 AT4G02280 AT5G37180 AT1G35910 AT1G70290
19748	Proceso metabólico secundario	AT2G26170 AT4G31500 AT2G34555 AT1G30040 AT5G26660 AT1G52400 AT1G02400 AT1G17170 AT2G44490 AT1G78970 AT2G02990 AT2G25450 AT1G61820 AT1G62540 AT5G17220 AT3G51430 AT2G29090 AT1G68320 AT4G22880 AT5G66690 AT4G39950 AT1G71030 AT1G78600 AT1G02950 AT2G22990 AT2G41290 AT3G29590 AT5G42800
16138	Proceso biosintético de glicósidos	AT1G62540 AT4G22590 AT5G10100 AT4G31500 AT2G25450 AT4G02280 AT5G37180 AT1G35910 AT1G70290
45487	Proceso catabólico de giberelinas	AT1G02400 AT2G34555 AT1G30040
48445	Morfogénesis del carpelo	AT5G09750 AT2G01500 AT3G50330
16103	Proceso catabólico diterpenoide	AT1G02400 AT2G34555 AT1G30040
10927	Unión de componentes celulares envueltos en la morfogenesis	AT5G40260 AT2G19070 AT1G01280 AT3G11980 AT5G22260
10208	Establecimiento pared celular	AT5G40260 AT2G19070 AT1G01280 AT3G11980 AT5G22260
31407	Proceso metabólico de oxilipina	AT5G07010 AT3G25760 AT3G25780 AT2G46370 AT3G45140 AT2G26560

REPRIMIDOS		
7127	Meiosis I	AT1G14750 AT3G13170 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
51321	Ciclo celular miótico	AT1G14750 AT3G13170 AT4G20900 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT2G13680 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
51327	Fase M del ciclo celular meiotico	AT1G14750 AT3G13170 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
7126	Meiosis	AT1G14750 AT3G13170 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
279	Fase M	AT1G14750 AT3G13170 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
45449	Regulación de la transcripción	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
70192	Organización de cromosomas relacionados con la meiosis	AT1G14750 AT3G13170 AT4G17380 AT1G22260 AT1G10710 AT1G67370
7129	Sinapsis	AT1G14750 AT3G13170 AT4G17380 AT1G22260 AT1G10710 AT1G67370
10556	Regulación del proceso de biosíntesis de macromoléculas	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
19219	Regulación del proceso metabólico de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
31326	Regulación del proceso biosintético celular	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
9889	Regulación de procesos de biosíntesis	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
51171	Regulación del proceso metabólico de los compuestos nitrogenados	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
22403	Fase del ciclo celular	AT1G14750 AT3G13170 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
80090	Regulación de procesos metabólicos primarios	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
10468	Regulación de la expresión génica	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
51276	Organización del cromosoma	AT1G14750 AT5G15380 AT3G27360 AT4G17380 AT1G10710 AT1G67370 AT3G13170 AT5G35600 AT5G05490 AT1G22260 AT1G54230 AT5G51330 AT1G54240

31323	Regulación del proceso metabólico celular	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
7049	Ciclo celular	AT1G14750 AT3G13170 AT4G20900 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT2G13680 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
60255	Regulación del proceso metabólico de macromoléculas	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
6355	Regulación de la transcripción, dependiente de DNA	AT5G15380 AT4G31615 AT3G28470 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT3G20750 AT5G25190 AT1G30950 AT5G64810 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT5G03790 AT1G24250 AT5G38740 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT4G31680 AT1G01520
51252	Regulación del proceso metabólico del RNA	AT5G15380 AT4G31615 AT3G28470 AT1G27260 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT3G20750 AT5G25190 AT1G30950 AT5G64810 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT5G03790 AT1G24250 AT5G38740 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT4G31680 AT1G01520
45132	Segregación meiótica de cromosomas	AT3G13170 AT5G05490 AT5G51330 AT5G48390
22402	Proceso de ciclo celular	AT1G14750 AT3G13170 AT5G05490 AT4G17380 AT1G22260 AT5G51330 AT1G10710 AT1G67370 AT5G48390
19222	Regulación de proceso metabólico	AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G56530 AT5G25190 AT5G46590 AT1G66170 AT2G22540 AT5G09780 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT2G40750 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G16210 AT1G27280 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT1G02450 AT4G31690 AT1G01520
9908	Desarrollo floral	AT5G14070 AT1G69180 AT2G22540 AT3G28470 AT4G38680 AT3G54560 AT5G61850 AT5G14010 AT2G02850 AT3G61730 AT1G13710 AT4G21330
51177	Cohesión de cromátidas hermanas meióticas	AT3G13170 AT5G05490 AT5G51330
7131	Recombinación meiótica recíproca	AT3G13170 AT1G22260 AT5G51330 AT5G48390
48443	Desarrollo de estomas	AT5G14070 AT3G28470 AT4G38680 AT2G02850 AT3G61730 AT4G21330
48466	Desarrollo de androceo	AT5G14070 AT3G28470 AT4G38680 AT2G02850 AT3G61730 AT4G21330
48653	Desarrollo de anteras	AT5G14070 AT3G28470 AT2G02850 AT3G61730 AT4G21330
10073	Mantenimiento del meristemo	AT5G09970 AT1G69180 AT2G22540 AT5G61850 AT5G14010 AT1G13710
10582	Determinación del meristemo floral	AT1G69180 AT2G22540 AT5G14010
48438	Desarrollo de verticilos florales	AT5G14070 AT1G69180 AT2G22540 AT3G28470 AT4G38680 AT2G02850 AT3G61730 AT4G21330
7059	Segregación de cromosomas	AT3G13170 AT5G05490 AT5G51330 AT5G48390
48658	Desarrollo de la capa tapetal	AT3G28470 AT3G61730 AT4G21330
10022	Determinación del meristemo	AT1G69180 AT2G22540 AT5G14010
50794	Regulación de proceso celular	AT1G14750 AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G57860 AT3G56530 AT3G56070 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G61850 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G13680 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT1G13710 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
48437	Desarrollo de órganos florales	AT5G14070 AT1G69180 AT3G28470 AT4G38680 AT2G02850 AT3G61730 AT1G13710 AT4G21330
6310	Recombinación de DNA	AT1G14750 AT3G13170 AT1G22260 AT5G51330 AT5G48390

51026	Establecimiento quiasma	AT1G14750 AT3G13170 AT1G67370
7062	Cohesión de cromátidas hermanas	AT3G13170 AT5G05490 AT5G51330
71103	Cambio conformación DNA	AT3G13170 AT3G27360 AT5G05490 AT4G38680 AT1G54230 AT1G54240
48507	Desarrollo meristemático	AT5G09970 AT1G69180 AT2G22540 AT5G61850 AT5G14010 AT1G13710
65007	Regulación biológica	AT2G03090 AT4G28250 AT3G56070 AT5G25190 AT5G09780 AT5G61850 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT5G15380 AT3G28470 AT5G14010 AT1G68200 AT1G27260 AT2G13680 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT3G20750 AT1G12520 AT1G69180 AT2G21060 AT1G77110 AT1G01520 AT1G14750 AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G57860 AT3G56530 AT2G22540 AT5G57720 AT5G58610 AT4G31680 AT5G14070 AT4G31615 AT5G15480 AT1G20925 AT1G64100 AT2G16210 AT1G13710 AT4G21330 AT1G30950 AT5G09970 AT5G64810 AT5G05490 AT5G62310 AT5G03790 AT3G17010 AT4G34400 AT4G31690
48646	Formación de estructuras anatómicas involucradas en la morfogénesis	AT2G03090 AT1G55580 AT5G03790 AT4G28250 AT2G13680 AT1G13710
7143	Meiosis hembra	AT5G51330 AT5G48390
50789	Regulación de proceso biológico	AT1G14750 AT1G06170 AT2G31220 AT1G55580 AT3G57860 AT3G56530 AT3G56070 AT5G25190 AT2G22540 AT5G09780 AT5G61850 AT5G57720 AT5G58610 AT1G24250 AT5G38740 AT5G66940 AT4G31680 AT5G14070 AT5G15380 AT4G31615 AT5G15480 AT3G28470 AT5G14010 AT1G64100 AT1G68200 AT1G27260 AT2G13680 AT2G16210 AT3G19184 AT1G16640 AT5G17800 AT1G13710 AT4G21330 AT3G20750 AT1G30950 AT5G09970 AT1G69180 AT5G64810 AT5G03790 AT3G17010 AT2G21060 AT4G34400 AT4G31690 AT1G01520
6021	Proceso biosintético de inositol	AT5G10170 AT2G22240
48569	Desarrollo de órganos post-embrionario	AT5G14070 AT1G69180 AT3G28470 AT4G38680 AT2G02850 AT3G61730 AT1G13710 AT4G21330
46173	Proceso biosintético de polioles	AT5G10170 AT2G22240
71451	Respuesta celular al superóxido	AT2G28190 AT1G08830
71450	Respuesta celular al radical de oxígeno	AT2G28190 AT1G08830
19430	Eliminación de radicales superóxido	AT2G28190 AT1G08830
6996	Organización organelo	AT1G14750 AT5G15380 AT3G27360 AT4G17380 AT1G10710 AT1G67370 AT3G13170 AT5G35600 AT5G05490 AT1G22260 AT4G09080 AT1G54230 AT5G51330 AT1G54240
303	Respuesta a superóxido	AT2G28190 AT1G08830
305	Respuesta a radicales de oxígeno	AT2G28190 AT1G08830
6801	Proceso metabólico de superóxido	AT2G28190 AT1G08830
6869	Transporte de lípidos	AT1G73890 AT5G62080 AT3G13900 AT3G07450 AT5G62065 AT5G52160
6323	Empaquetamiento de DNA	AT3G27360 AT5G05490 AT1G54230 AT1G54240
16043	Organización de componente celular	AT1G14750 AT5G15380 AT3G27360 AT2G03090 AT4G17380 AT4G28250 AT2G13680 AT1G10710 AT4G03330 AT1G67370 AT3G13170 AT5G35600 AT5G05490 AT5G62310 AT1G22260 AT4G09080 AT1G54230 AT5G51330 AT1G54240
7140	Meiosis masculina	AT5G51330 AT5G48390
10876	Localización de lípidos	AT1G73890 AT5G62080 AT3G13900 AT3G07450 AT5G62065 AT5G52160
10039	Respuesta a ion hierro	AT2G28190 AT1G08830

ANEXO III. Categorías GO de los DEGs en todo el desarrollo de <i>spl-quad</i> vs Col-0		
ID GO	Descripción GO	Genes
50896	Respuesta a estímulo	AT2G04160 AT4G25100 AT4G25420 AT3G09600 AT1G56150 AT3G49120 AT3G04210 AT3G25770 AT2G39920 AT3G51860 AT4G18290 AT5G52310 AT1G72930 AT4G25480 AT1G16510 AT1G68050 AT3G11280 AT1G74670 AT3G62550 AT3G11480 AT4G30650 AT1G75580 AT5G59220 AT4G10380 AT3G12830 AT4G03400 AT4G23170 AT1G06460 AT3G22370 AT5G24470 AT2G14210 AT1G13930 AT2G40080 AT1G19180 AT2G22330 AT2G21660 AT2G21220 AT2G38170 AT1G01060 AT1G52890 AT4G18010 AT1G20980 AT2G45050 AT2G42540 AT2G47750 AT4G38860 AT5G42900
48511	Proceso rítmico	AT4G25100 AT2G21660 AT5G60100 AT4G18290 AT3G46640 AT5G24470 AT1G68050
7623	Ritmo circadiano	AT4G25100 AT2G21660 AT5G60100 AT4G18290 AT3G46640 AT5G24470 AT1G68050
9628	Respuesta a estímulo abiótico	AT4G03400 AT4G25420 AT3G09600 AT3G49120 AT3G25770 AT1G06460 AT3G22370 AT4G18290 AT5G52310 AT5G24470 AT4G25480 AT1G13930 AT1G68050 AT2G40080 AT2G21660 AT2G38170 AT1G01060 AT1G52890 AT4G30650 AT2G45050 AT2G42540 AT5G59220 AT5G42900
42221	Respuesta a estímulo químico	AT2G04160 AT4G25100 AT4G25420 AT3G09600 AT1G56150 AT2G39920 AT3G51860 AT5G52310 AT4G25480 AT1G16510 AT3G11280 AT1G74670 AT1G75580 AT5G59220 AT4G10380 AT3G12830 AT4G03400 AT4G23170 AT2G14210 AT1G19180 AT2G21660 AT2G21220 AT1G01060 AT1G52890 AT4G18010 AT2G47750 AT4G38860
9733	Respuesta a auxinas	AT2G04160 AT4G03400 AT3G09600 AT1G56150 AT2G21220 AT1G01060 AT1G75580 AT1G16510 AT2G47750 AT4G38860 AT3G12830
9719	Respuesta a estímulo endógeno	AT2G04160 AT4G03400 AT4G25420 AT3G09600 AT1G56150 AT5G52310 AT1G16510 AT3G11280 AT1G19180 AT1G74670 AT2G21220 AT1G01060 AT4G18010 AT1G75580 AT5G59220 AT2G47750 AT4G38860 AT3G12830
9725	Respuesta a hormonas	AT2G04160 AT4G03400 AT4G25420 AT3G09600 AT1G56150 AT5G52310 AT1G16510 AT3G11280 AT1G74670 AT2G21220 AT1G01060 AT4G18010 AT1G75580 AT5G59220 AT2G47750 AT4G38860 AT3G12830
10033	Respuesta a sustancia orgánica	AT2G04160 AT4G03400 AT4G25420 AT3G09600 AT1G56150 AT4G23170 AT5G52310 AT1G16510 AT3G11280 AT1G19180 AT1G74670 AT2G21220 AT1G01060 AT4G18010 AT1G75580 AT5G59220 AT2G47750 AT4G38860 AT3G12830
9409	Respuesta a frío	AT2G21660 AT3G25770 AT3G22370 AT2G38170 AT5G52310 AT4G30650 AT4G25480 AT2G42540 AT5G42900
9266	Respuesta a temperatura	AT2G21660 AT3G25770 AT1G06460 AT3G22370 AT2G38170 AT5G52310 AT4G30650 AT4G25480 AT2G42540 AT5G42900
6950	Respuesta a estrés	AT4G25100 AT3G09600 AT3G49120 AT3G04210 AT3G25770 AT1G06460 AT3G22370 AT5G52310 AT1G72930 AT4G25480 AT1G13930 AT1G19180 AT2G22330 AT2G21660 AT3G62550 AT2G38170 AT1G01060 AT3G11480 AT1G52890 AT1G20980 AT4G30650 AT2G42540 AT5G59220 AT5G42900
6882	Homeostasis celular al ion zinc	AT3G51860 AT2G38170
9416	Respuesta a luz	AT4G03400 AT4G25420 AT2G40080 AT3G49120 AT4G18290 AT1G01060 AT5G24470 AT2G45050 AT2G42540 AT1G68050
9314	Respuesta a radiación	AT4G03400 AT4G25420 AT2G40080 AT3G49120 AT4G18290 AT1G01060 AT5G24470 AT2G45050 AT2G42540 AT1G68050
30026	Homeostasis celular al ion manganeso	AT3G51860 AT2G38170
9631	Aclimatación a frío	AT2G38170 AT4G25480 AT2G42540
9739	Respuesta a giberelinas	AT4G25420 AT3G11280 AT3G09600 AT1G74670 AT1G01060
55069	Homeostasis ion zinc	AT3G51860 AT2G38170
55071	Homeostasis ion manganeso	AT3G51860 AT2G38170
48573	Fotoperiodo, floración	AT4G25420 AT2G40080 AT1G01060
6970	Respuesta a estrés osmótico	AT3G09600 AT2G21660 AT2G38170 AT1G01060 AT5G52310 AT4G30650 AT2G42540 AT1G13930
10228	Transición del meristemo vegetativo a reproductivo	AT4G25420 AT2G40080 AT2G21660 AT1G01060
9648	Fotoperiodo	AT4G25420 AT2G40080 AT1G01060
65007	Regulación biológica	AT4G25420 AT3G09600 AT3G49120 AT3G04210 AT3G51860 AT2G47070 AT1G72930 AT4G25480 AT1G68050 AT3G11280 AT4G39940 AT3G60030 AT5G56970 AT5G04470 AT5G60100 AT3G46640 AT3G59510 AT3G62960 AT2G30540 AT2G18550 AT2G40080 AT2G22330 AT2G21660 AT5G57630 AT2G38170 AT1G01060 AT1G76580 AT3G46770 AT1G20980
9651	Respuesta a estrés salino	AT3G09600 AT2G21660 AT2G38170 AT1G01060 AT5G52310 AT4G30650 AT1G13930

ANEXO IV. Categorías GO de los DEGs activados y reprimidos en <i>spl-quad3</i> sda vs AP2ind.		
ID GO	Descripción GO	Genes
ACTIVADOS en <i>quad-spl</i> y REPRIMIDO en AP2ind		
50896	Respuesta a estímulo	AT5G50950 AT3G25770 AT5G14780 AT5G54510 AT5G14740 AT4G27440 AT1G55920 AT4G13830 AT5G06870 AT1G28330 AT3G50970 AT1G80920 AT5G20250 AT1G13930 AT4G36040 AT5G56860 AT2G38170 AT1G69850 AT2G45170 AT3G47340 AT2G42540 AT3G11930 AT1G20620 AT2G47750 AT4G38860 AT2G04160 AT2G35940 AT4G39090 AT1G30040 AT5G52310 AT3G62410 AT4G25480 AT5G66880 AT2G15890 AT2G18050 AT5G56550 AT1G01470 AT4G37260 AT1G75380 AT4G30270 AT4G36410 AT3G02480 AT2G43535 AT5G24470 AT5G15960 AT1G11210 AT1G71030 AT1G19660 AT1G52890 AT3G10020 AT3G45780 AT4G35770
6950	Respuesta a estrés	AT5G50950 AT4G39090 AT3G25770 AT5G14780 AT5G52310 AT5G14740 AT4G25480 AT5G66880 AT1G55920 AT2G15890 AT2G18050 AT5G56550 AT4G13830 AT1G01470 AT5G06870 AT1G75380 AT3G50970 AT1G80920 AT5G20250 AT3G02480 AT2G43535 AT5G15960 AT1G13930 AT1G11210 AT1G71030 AT4G36040 AT2G38170 AT1G19660 AT1G52890 AT3G10020 AT2G45170 AT3G47340 AT2G42540 AT3G11930 AT4G35770 AT1G20620
9628	Respuesta a estímulo abiótico	AT2G35940 AT5G50950 AT4G39090 AT3G25770 AT1G30040 AT5G52310 AT3G62410 AT4G25480 AT5G66880 AT1G55920 AT1G01470 AT3G50970 AT5G20250 AT3G02480 AT5G52440 AT5G15960 AT1G13930 AT1G71030 AT5G56860 AT2G38170 AT1G52890 AT3G45780 AT3G47340 AT2G42540 AT1G20620
9631	Aclimatación al frío	AT2G38170 AT3G50970 AT5G15960 AT4G25480 AT2G42540
42221	Respuesta a estímulo químico	AT2G04160 AT2G35940 AT4G39090 AT5G14780 AT5G52310 AT5G54510 AT3G62410 AT4G25480 AT4G27440 AT5G66880 AT2G18050 AT5G56550 AT1G01470 AT4G37260 AT1G28330 AT3G50970 AT4G30270 AT4G36410 AT3G02480 AT5G15960 AT1G11210 AT1G71030 AT5G56860 AT1G52890 AT3G10020 AT3G47340 AT4G35770 AT1G20620 AT2G47750 AT4G38860
9414	Respuesta a privación de agua	AT2G18050 AT4G39090 AT1G01470 AT3G02480 AT5G52310 AT1G52890 AT3G50970 AT5G15960 AT4G25480 AT5G66880
9415	Respuesta a agua	AT2G18050 AT4G39090 AT1G01470 AT3G02480 AT5G52310 AT1G52890 AT3G50970 AT5G15960 AT4G25480 AT5G66880
9409	Respuesta a frío	AT3G25770 AT2G38170 AT5G20250 AT5G52310 AT3G50970 AT5G15960 AT4G25480 AT2G42540 AT1G55920 AT1G20620
10033	Respuesta a sustancia orgánica	AT2G04160 AT2G35940 AT5G52310 AT5G54510 AT3G62410 AT5G15960 AT4G27440 AT5G66880 AT1G71030 AT4G37260 AT5G56860 AT1G28330 AT3G47340 AT3G50970 AT4G30270 AT4G36410 AT4G35770 AT2G47750 AT4G38860
9266	Respuesta a temperatura	AT3G25770 AT2G38170 AT5G20250 AT5G52310 AT3G50970 AT5G15960 AT4G25480 AT2G42540 AT1G55920 AT1G20620
9416	Respuesta a luz	AT2G35940 AT1G01470 AT5G56860 AT1G30040 AT5G24470 AT3G62410 AT3G45780 AT3G47340 AT5G15960 AT2G42540 AT1G20620
9269	Respuesta a desecación	AT4G39090 AT1G01470 AT5G52310
9314	Respuesta a radiación	AT2G35940 AT1G01470 AT5G56860 AT1G30040 AT5G24470 AT3G62410 AT3G45780 AT3G47340 AT5G15960 AT2G42540 AT1G20620
9719	Respuesta a estímulo endógeno	AT2G04160 AT2G35940 AT5G52310 AT5G54510 AT5G15960 AT4G27440 AT5G66880 AT1G71030 AT4G37260 AT3G50970 AT4G30270 AT4G36410 AT4G35770 AT2G47750 AT4G38860
19318	Proceso metabólico hexosas	AT4G26530 AT3G47800 AT1G43670 AT4G04040 AT1G13700
9749	Respuesta a glucosa	AT5G56860 AT1G28330 AT3G47340
9725	Respuesta a hormonas	AT2G04160 AT2G35940 AT5G52310 AT5G54510 AT5G15960 AT4G27440 AT5G66880 AT1G71030 AT4G37260 AT3G50970 AT4G30270 AT4G36410 AT2G47750 AT4G38860
34284	Respuesta a monosacáridos	AT5G56860 AT1G28330 AT3G47340
9746	Respuesta a hexosas	AT5G56860 AT1G28330 AT3G47340
15976	Utilización del carbono	AT5G14740 AT1G58180
6970	Respuesta a estrés osmótico	AT1G71030 AT5G50950 AT4G39090 AT2G38170 AT5G52310 AT5G15960 AT5G66880 AT2G42540 AT1G13930
5996	Proceso metabólico de los monosacáridos	AT4G26530 AT3G47800 AT1G43670 AT4G04040 AT1G13700
9750	Respuesta a fructosa	AT1G28330 AT3G47340
9744	Respuesta a sacarosa	AT1G28330 AT3G62410 AT3G47340
34285	Respuesta a disacáridos	AT1G28330 AT3G62410 AT3G47340
10214	Desarrollo de la cubierta de la semilla	AT5G63800 AT5G49360
9737	Respuesta a ácido abscísico	AT1G71030 AT2G35940 AT4G37260 AT5G52310 AT3G50970 AT5G15960 AT5G66880

REPRIMIDOS en <i>quad-spl</i> y ACTIVADOS en AP2ind		
6949	Formación de sincitio	AT2G03090 AT4G28250
9828	Debilitamiento de la pared celular vegetal	AT2G03090 AT4G28250
9827	Modificación de la pared celular vegetal	AT2G03090 AT4G28250
7065	Cohesión de cromátidas hermanas durante la meiosis masculina	AT5G51330
7066	Cohesión de cromátidas hermanas durante la meiosis femenina	AT5G51330
9664	Organización de la pared celular vegetal	AT2G03090 AT4G28250
48646	Formación de estructuras anatómicas involucradas en la morfogénesis	AT2G03090 AT4G28250
10264	Proceso biosintético de mioinositol hexakisfosfato	AT2G22240
32958	Proceso biosintético de fosfato de inositol	AT2G22240
33517	Proceso metabólico de mioinositol hexakisfosfato	AT2G22240
16043	Organización de componentes celulares	AT2G03090 AT3G27360 AT4G28250 AT5G51330
42545	Modificación de la pared celular	AT2G03090 AT4G28250
7143	Meiosis femenina	AT5G51330
51177	Cohesión de cromátidas hermanas meióticas	AT5G51330
71669	Organización o biogénesis de la pared celular de tipo vegetal	AT2G03090 AT4G28250
6021	Proceso biosintético de inositol	AT2G22240
46173	Proceso biosintético de polioles	AT2G22240
9620	Respuesta a hongos	AT3G22231 AT2G22240
71555	Organización de la pared celular	AT2G03090 AT4G28250
19509	Recuperación de L-metionina de metiltioadenosina	AT2G26400
43102	Recuperación de aminoácidos	AT2G26400
71267	Recuperación de L-metionina	AT2G26400
6790	Proceso metabólico de sulfuro	AT2G26400 AT4G35640

71265	Proceso biosíntesis de L-methionine	AT2G26400
43647	Proceso metabólico del fosfato de inositol	AT2G22240
9826	Crecimiento celular unidimensional	AT2G03090 AT4G28250
60560	Crecimiento evolutivo implicado en la morfogénesis	AT2G03090 AT4G28250
7140	Meiosis masculina	AT5G51330

ANEXO V. Secuencia de aminoácidos predicha de HB21 y HB21-3.

HB21:

MNNQNVDDHNLLISQLYPNVYTPLVPQQGGEAKPTRRRKRKSKSVVVAEEGENEGNG
WFRKRKLSDEQVRMLEISFEDDHKLESERKDRLASELGLDPRQVAVWFQNRARRWKNKRVE
DEYTKLKNAYETTVVEKCRLDSEVIHLKEQLYEAEREIQRLAKRVEGTLNSPISSSVTIEANHTT
PFFGDYDIGFDGEADENLLYSPDYIDGLDWMSQFM

HB21-3:

MNNQNVDDHNLLISQLYPNVYTPLVPQQGGEAKPTSRMNTLN SRMHTKPPSLRNVV
LILRLFT

En amarillo se muestra la región conservada tras el CRISPR.

ANEXO VI: Categorías GO de los DEGs activados y reprimidos al inducir HB21		
ID GO	Descripción GO	Genes
ACTIVADOS		
50896	Respuesta a estímulo	AT3G59900 AT3G22060 AT3G23030 AT4G18290 AT1G10170 AT1G72930 AT4G02380 AT1G73500 AT1G32920 AT1G55920 AT1G05010 AT4G34135 AT1G80840 AT1G46768 AT2G46450 AT2G26560 AT3G04120 AT1G61410 AT5G50200 AT3G03270 AT5G24530 AT3G19580 AT5G27760 AT4G21870 AT1G72940 AT1G32870 AT5G36910 AT4G33050 AT1G27730 AT4G17500 AT1G01560 AT1G02930 AT1G75490 AT3G45680 AT5G13370 AT3G10520 AT2G26150 AT1G03220 AT2G23680 AT4G38860 AT4G25200 AT4G02520 AT3G23050 AT1G14870 AT3G55880 AT1G30040 AT5G65310 AT3G58350 AT2G30770 AT2G36750 AT3G57260 AT2G30250 AT2G41380 AT2G47520 AT5G08790 AT3G46600 AT1G49570 AT1G78410 AT3G14210 AT2G44490 AT5G59820 AT5G58610 AT2G31865 AT2G47000 AT2G46790 AT5G54490 AT3G50480 AT5G51830 AT3G23560 AT3G26830 AT1G28370 AT1G75830 AT1G19020 AT1G18570 AT1G08810 AT5G17390 AT5G15090 AT2G40340 AT1G08930 AT4G25100 AT3G09600 AT5G26920 AT5G47220 AT3G25770 AT2G16720 AT3G49620 AT3G57240 AT5G64120 AT5G63790 AT2G38470 AT5G49480 AT2G15080 AT5G38900 AT1G52200 AT1G76930 AT3G61460 AT1G76650 AT5G51440 AT4G18880 AT2G03760 AT1G75040 AT5G43700 AT3G50970 AT5G58070 AT4G14560 AT1G62300 AT3G49110 AT3G22370 AT3G25760 AT1G55450 AT1G57630 AT5G64750 AT1G72900 AT2G32020 AT3G04720 AT3G13790 AT2G44080 AT3G12580 AT1G75050 AT2G25140 AT1G42990 AT3G52400 AT4G11280 AT4G15760 AT1G33590 AT1G56150 AT5G22300 AT5G26220 AT4G08780 AT2G15130 AT1G74650 AT1G02400 AT5G57560 AT1G19050 AT1G02920 AT3G11020 AT5G62520 AT2G41100 AT4G17250 AT5G20230 AT4G17490 AT1G06160 AT3G28930 AT3G22310 AT2G15480 AT1G66480 AT2G47730 AT1G19180 AT2G21640 AT3G15352 AT4G38840 AT5G37500 AT2G15490 AT2G16060 AT4G37910 AT2G26650 AT1G76680 AT4G12470
6950	Respuesta a estrés	AT1G10170 AT1G72930 AT4G02380 AT1G73500 AT1G32920 AT1G55920 AT1G80840 AT1G46768 AT2G26560 AT3G04120 AT1G61410 AT5G50200 AT3G03270 AT3G19580 AT5G27760 AT4G21870 AT1G72940 AT5G36910 AT1G27730 AT1G02930 AT2G26150 AT1G03220 AT2G23680 AT4G25200 AT4G02520 AT3G23050 AT1G14870 AT3G55880 AT2G30770 AT3G57260 AT2G30250 AT2G47520 AT5G08790 AT1G49570 AT1G78410 AT3G14210 AT2G44490 AT5G59820 AT2G31865 AT3G26830 AT1G75830 AT1G19020 AT1G18570 AT1G08810 AT5G17390 AT5G15090 AT2G40340 AT1G08930 AT4G25100 AT3G09600 AT5G26920 AT5G47220 AT3G25770 AT2G16720 AT3G49620 AT5G64120 AT5G63790 AT2G38470 AT5G49480 AT2G15080 AT5G38900 AT1G52200 AT1G76930 AT1G76650 AT5G51440 AT2G03760 AT1G75040 AT3G50970 AT5G58070 AT1G62300 AT3G49110 AT3G22370 AT3G25760 AT1G55450 AT1G57630 AT5G64750 AT1G72900 AT3G04720 AT3G13790 AT3G12580 AT2G25140 AT1G42990 AT3G52400 AT4G11280 AT1G33590 AT5G22300 AT4G08780 AT2G15130 AT5G57560 AT1G02920 AT3G11020 AT5G62520 AT4G17250 AT5G20230 AT1G06160 AT3G22310 AT2G47730 AT1G19180 AT2G21640 AT4G38840 AT5G37500 AT2G16060 AT4G37910 AT2G26650 AT1G76680 AT4G12470
42221	Respuesta a estímulo químico	AT3G59900 AT4G25100 AT3G09600 AT5G26920 AT3G22060 AT5G47220 AT3G23030 AT2G16720 AT1G10170 AT4G02380 AT5G63790 AT2G38470 AT1G73500 AT1G52200 AT1G76930 AT3G61460 AT4G18880 AT2G03760 AT1G75040 AT5G43700 AT3G50970 AT1G80840 AT1G46768 AT2G26560 AT4G14560 AT3G04120 AT1G62300 AT5G50200 AT3G25760 AT3G19580 AT5G27760 AT5G64750 AT2G32020 AT3G04720 AT4G33050 AT1G27730 AT4G17500 AT1G01560 AT1G02930 AT2G44080 AT3G12580 AT1G75490 AT1G42990 AT5G13370 AT3G52400 AT3G10520 AT2G26150 AT4G11280 AT4G38860 AT4G02520 AT4G02520 AT3G23050 AT1G14870 AT1G56150 AT5G22300 AT5G26220 AT5G65310 AT4G08780 AT2G41380 AT1G74650 AT2G47520 AT5G57560 AT5G08790 AT3G46600 AT1G19050 AT1G49570 AT1G78410 AT1G02920 AT3G11020 AT5G59820 AT5G58610 AT2G47000 AT5G54490 AT5G20230 AT5G51830 AT4G17490 AT1G06160 AT3G23560 AT3G26830 AT1G28370 AT3G22310 AT1G19180 AT2G21640 AT3G15352 AT4G38840 AT5G37500 AT2G16060 AT1G19020 AT1G18570 AT4G37910 AT1G76680 AT1G08810 AT2G40340 AT1G08930
9607	Respuesta a estímulo biótico	AT4G02520 AT5G26920 AT5G47220 AT1G10170 AT3G57240 AT3G58350 AT5G64120 AT2G38470 AT2G30770 AT3G57260 AT5G38900 AT5G08790 AT1G02920 AT3G14210 AT2G44490 AT1G05010 AT1G75040 AT2G31865 AT4G34135 AT3G50970 AT1G80840 AT2G46450 AT2G26560 AT3G50480 AT3G49110 AT5G24530 AT1G06160 AT3G26830 AT5G64750 AT3G28930 AT2G15480 AT3G04720 AT2G47730 AT1G19180 AT3G15352 AT2G15490 AT1G02930 AT1G18570 AT3G12580 AT1G75050 AT3G45680 AT1G42990 AT3G52400 AT2G26150 AT4G15760 AT5G15090 AT4G12470
51707	Respuesta a otro organismo	AT4G02520 AT5G26920 AT5G47220 AT1G10170 AT3G57240 AT3G58350 AT5G64120 AT2G38470 AT2G30770 AT3G57260 AT5G38900 AT5G08790 AT1G02920 AT3G14210 AT2G44490 AT1G05010 AT1G75040 AT2G31865 AT4G34135 AT3G50970 AT1G80840 AT2G46450 AT2G26560 AT3G50480 AT3G49110 AT5G24530 AT1G06160 AT3G26830 AT5G64750 AT3G28930 AT2G15480 AT3G04720 AT2G47730 AT1G19180 AT3G15352 AT2G15490 AT1G02930 AT1G18570 AT3G12580 AT1G75050 AT3G45680 AT3G52400 AT4G15760 AT5G15090 AT4G12470
10200	Respuesta a quitina	AT1G62300 AT5G47220 AT4G17490 AT3G19580 AT2G38470 AT4G33050 AT1G74650 AT1G27730 AT4G17500 AT3G46600 AT1G19050 AT3G61460 AT5G59820 AT5G58610 AT1G75490 AT4G18880 AT1G42990 AT1G80840 AT2G26150 AT1G08930
9743	Respuesta al estímulo de carbohidratos	AT3G04120 AT1G62300 AT5G47220 AT4G17490 AT3G19580 AT5G64750 AT2G38470 AT4G33050 AT1G74650 AT1G27730 AT5G08790 AT4G17500 AT3G46600 AT1G19050 AT3G61460 AT5G59820 AT5G58610 AT1G75490 AT4G18880 AT1G42990 AT1G80840 AT2G26150 AT1G08930

51704	Proceso de múltiples organismos	AT4G02520 AT4G27300 AT5G26920 AT5G47220 AT1G10170 AT3G57240 AT3G58350 AT5G64120 AT2G38470 AT2G30770 AT3G57260 AT5G38900 AT5G08790 AT1G02920 AT3G14210 AT2G44490 AT1G05010 AT1G75040 AT2G31865 AT4G34135 AT3G50970 AT1G80840 AT2G64650 AT2G26560 AT3G50480 AT3G49110 AT5G24530 AT1G06160 AT3G26830 AT5G64750 AT3G28930 AT2G15480 AT3G04720 AT2G47730 AT1G19180 AT3G15352 AT2G15490 AT1G02930 AT5G07530 AT1G18570 AT3G12580 AT1G75050 AT3G45680 AT3G52400 AT4G15760 AT5G15090 AT4G12470
10033	Respuesta a sustancia organica	AT3G59900 AT3G09600 AT5G26920 AT3G22060 AT5G47220 AT3G23030 AT2G16720 AT2G38470 AT1G73500 AT1G76930 AT3G61460 AT4G18880 AT2G03760 AT5G43700 AT3G50970 AT1G80840 AT4G14560 AT3G04120 AT1G62300 AT3G19580 AT5G64750 AT2G32020 AT3G04720 AT4G33050 AT1G27730 AT4G17500 AT1G01560 AT2G44080 AT1G75490 AT1G42990 AT5G13370 AT3G52400 AT3G10520 AT2G26150 AT4G11280 AT4G38860 AT3G23050 AT1G56150 AT5G65310 AT1G74650 AT5G57560 AT5G08790 AT3G46600 AT1G19050 AT5G59820 AT5G58610 AT2G47000 AT5G54490 AT4G17490 AT1G06160 AT3G26830 AT1G28370 AT1G19180 AT4G38840 AT5G37500 AT1G18570 AT1G76680 AT1G08810 AT2G40340 AT1G08930
9628	Respuesta al estímulo abiótico	AT3G09600 AT3G25770 AT2G16720 AT4G18290 AT1G10170 AT4G02380 AT2G38470 AT1G73500 AT5G49480 AT1G55920 AT5G51440 AT2G03760 AT1G75040 AT3G50970 AT5G58070 AT1G46768 AT3G04120 AT3G49110 AT3G22370 AT3G25760 AT1G55450 AT3G19580 AT5G64750 AT4G21870 AT1G32870 AT3G04720 AT1G27730 AT1G02930 AT3G12580 AT2G25140 AT2G26150 AT1G03220 AT4G11280 AT4G25200 AT4G02520 AT3G23050 AT1G30040 AT2G36750 AT3G57260 AT2G30250 AT1G02400 AT5G57560 AT5G08790 AT1G02920 AT3G14210 AT3G11020 AT5G62520 AT5G59820 AT2G41100 AT4G17250 AT2G47000 AT2G46790 AT5G20230 AT3G22310 AT1G66480 AT2G47730 AT4G38840 AT5G37500 AT1G18570 AT4G37910 AT2G26650 AT1G08810 AT2G40340 AT1G08930
9266	Respuesta a temperatura	AT4G25200 AT4G02520 AT3G25770 AT4G02380 AT2G38470 AT1G55920 AT3G57260 AT2G30250 AT5G57560 AT3G14210 AT3G11020 AT5G59820 AT5G51440 AT2G41100 AT4G17250 AT3G50970 AT5G58070 AT1G46768 AT2G46790 AT3G04120 AT3G22370 AT2G22370 AT3G22310 AT2G47730 AT1G27730 AT4G38840 AT5G37500 AT3G12580 AT2G25140 AT2G26150 AT2G40340
9617	Respuesta a bacteria	AT4G02520 AT5G26920 AT5G47220 AT3G49110 AT5G24530 AT1G10170 AT3G26830 AT3G57240 AT3G28930 AT2G38470 AT2G30770 AT2G47730 AT1G19180 AT3G15352 AT1G02930 AT1G02920 AT3G14210 AT2G44490 AT1G18570 AT3G12580 AT1G80840 AT4G15760 AT5G15090
9620	Respuesta a hongo	AT3G49110 AT5G24530 AT5G64750 AT5G64120 AT2G38470 AT2G30770 AT3G04720 AT5G38900 AT5G08790 AT1G02920 AT2G44490 AT1G05010 AT2G31865 AT3G50970 AT1G80840 AT3G52400 AT2G46450 AT4G12470
6952	Respuesta de defensa	AT4G02520 AT1G33590 AT5G26920 AT5G47220 AT1G10170 AT1G72930 AT5G64120 AT2G38470 AT2G30770 AT3G57260 AT2G15130 AT2G15080 AT5G38900 AT1G02920 AT3G14210 AT2G44490 AT2G03760 AT1G75040 AT2G31865 AT3G50970 AT1G80840 AT2G26560 AT3G49110 AT1G06160 AT3G26830 AT1G57630 AT5G64750 AT1G72940 AT5G36910 AT1G72900 AT3G04720 AT2G47730 AT1G19180 AT1G75830 AT1G02930 AT1G18570 AT3G52400 AT5G15090 AT4G12470
19748	Poceso metabólico secundario	AT4G02520 AT2G29460 AT1G33030 AT1G30040 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770 AT5G62480 AT1G02400 AT1G17170 AT1G02920 AT3G14210 AT2G44490 AT4G34135 AT5G52570 AT2G29490 AT5G24530 AT3G26830 AT2G47730 AT1G72680 AT1G17180 AT1G02930 AT1G18570 AT1G69930 AT3G29590 AT3G13610
9404	Proceso metabólico de toxinas	AT2G47730 AT4G02520 AT2G29490 AT2G29460 AT1G17180 AT1G02930 AT1G17170 AT1G02920 AT1G69930 AT5G62480
9407	Proceso catabólico de toxinas	AT2G47730 AT4G02520 AT2G29490 AT2G29460 AT1G17180 AT1G02930 AT1G17170 AT1G02920 AT1G69930 AT5G62480
9611	Respuesta a herida	AT5G20230 AT3G23050 AT5G50200 AT1G06160 AT1G73500 AT1G32920 AT1G27730 AT5G08790 AT1G76930 AT1G76650 AT3G13790 AT5G59820 AT1G76680 AT1G80840 AT4G11280
50832	Respuesta de defensa a hongos	AT3G49110 AT5G64750 AT5G64120 AT2G38470 AT2G30770 AT3G04720 AT5G38900 AT1G02920 AT2G44490 AT2G31865 AT3G50970 AT1G80840 AT3G52400 AT4G12470
9719	Respuesta a estímulo endógeno	AT3G59900 AT3G09600 AT3G23050 AT1G56150 AT3G22060 AT5G47220 AT3G23030 AT5G65310 AT1G73500 AT1G74650 AT5G57560 AT5G08790 AT1G76930 AT1G19050 AT3G61460 AT5G43700 AT3G50970 AT2G47000 AT5G54490 AT4G14560 AT4G17490 AT1G06160 AT3G19580 AT3G26830 AT5G64750 AT1G28370 AT2G32020 AT3G04720 AT1G27730 AT4G38840 AT5G37500 AT1G01560 AT1G18570 AT2G44080 AT5G13370 AT3G52400 AT3G10520 AT4G11280 AT1G08810 AT2G40340 AT1G08930 AT4G38860
9651	Respuesta a estrés salino	AT4G02520 AT3G09600 AT2G16720 AT1G10170 AT2G38470 AT1G73500 AT5G49480 AT2G30250 AT1G02920 AT5G62520 AT5G59820 AT2G03760 AT3G04120 AT1G55450 AT3G19580 AT3G22310 AT3G04720 AT2G47730 AT1G27730 AT1G02930 AT1G18570 AT4G37910 AT2G26650 AT1G03220 AT1G08930
6970	Respuesta a estrés osmótico	AT4G02520 AT3G09600 AT2G16720 AT1G10170 AT2G38470 AT1G73500 AT5G49480 AT2G30250 AT1G02920 AT5G62520 AT5G59820 AT2G03760 AT3G04120 AT1G55450 AT3G19580 AT5G64750 AT3G22310 AT3G04720 AT2G47730 AT1G27730 AT1G02930 AT1G18570 AT4G37910 AT2G26650 AT1G03220 AT1G08930
9725	Respuesta a hormonas	AT3G59900 AT3G09600 AT3G23050 AT1G56150 AT3G22060 AT5G47220 AT3G23030 AT5G65310 AT1G73500 AT1G74650 AT5G57560 AT1G76930 AT1G19050 AT3G61460 AT5G43700 AT3G50970 AT2G47000 AT5G54490 AT4G14560 AT4G17490 AT1G06160 AT3G19580 AT3G26830 AT5G64750 AT1G28370 AT2G32020 AT3G04720 AT1G27730 AT4G38840 AT5G37500 AT1G01560 AT1G18570 AT2G44080 AT5G13370 AT3G10520 AT4G11280 AT1G08810 AT2G40340 AT1G08930 AT4G38860
9408	Respuesta a calor	AT4G25200 AT3G04120 AT4G21870 AT2G38470 AT5G57560 AT3G11020 AT5G59820 AT3G12580 AT5G51440 AT2G25140 AT4G17250 AT5G58070 AT2G26150 AT2G40340
9409	Respuesta a frío	AT4G02520 AT3G25770 AT3G22370 AT4G02380 AT2G38470 AT3G22310 AT1G55920 AT3G57260 AT2G30250 AT2G47730 AT1G27730 AT5G57560 AT4G38840 AT5G37500 AT3G14210 AT5G59820 AT3G50970 AT5G58070 AT1G46768

6790	Proceso metabólico de sulfuro	AT1G62180 AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770 AT4G21990 AT3G14210 AT2G44490 AT2G26400 AT3G14990 AT1G01480 AT1G18570 AT1G05010 AT4G35640 AT4G11280
42742	Respuesta de defensa a bacterias	AT4G02520 AT5G26920 AT5G47220 AT3G49110 AT1G10170 AT2G38470 AT2G30770 AT2G47730 AT1G19180 AT1G02930 AT1G02920 AT3G14210 AT2G44490 AT1G18570 AT1G80840 AT5G15090
52317	Proceso metabólico camalexina	AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
10120	Proceso catabólico camalexina	AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
52314	Proceso metabólico de la fitoalexina	AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
52315	Proceso biosintético de fitoalexina	AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
46217	Proceso metabólico de indol fitoalexina	AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
42431	Proceso metabólico del indol	AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
9700	Proceso biosintético de indol fitoalexina	AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
70482	Respuesta a niveles de oxígeno	AT2G47520 AT2G16060 AT5G27760 AT5G63790 AT2G26150
9414	Respuesta a privación de agua	AT3G23050 AT3G25760 AT3G19580 AT4G02380 AT2G38470 AT3G22310 AT1G27730 AT5G37500 AT1G02930 AT3G11020 AT3G50970 AT1G46768 AT1G08810 AT1G08930
9753	Respuesta a ácido jasmónico	AT1G19180 AT3G09600 AT5G37500 AT5G08790 AT3G23050 AT1G76930 AT5G47220 AT1G06160 AT1G18570 AT3G52400 AT4G11280 AT1G08810
6355	Regulación de la transcripción, dependiente de DNA	AT5G47220 AT2G31420 AT2G16720 AT1G10170 AT5G65310 AT1G67120 AT2G38470 AT2G30250 AT1G74650 AT2G46310 AT2G47520 AT3G11020 AT5G58610 AT4G19630 AT1G80840 AT1G46768 AT5G52170 AT1G62300 AT4G17490 AT1G06160 AT5G24110 AT2G38340 AT5G64750 AT3G61630 AT1G28370 AT3G01970 AT5G64810 AT4G17500 AT5G13330 AT1G18570 AT1G75490 AT1G42990 AT1G44830 AT1G08810 AT2G40340 AT1G75390
51252	Regulación del proceso metabólico de RNA	AT5G47220 AT2G31420 AT2G16720 AT1G10170 AT5G65310 AT1G67120 AT2G38470 AT2G30250 AT1G74650 AT2G46310 AT2G47520 AT3G11020 AT5G58610 AT4G19630 AT1G80840 AT1G46768 AT5G52170 AT1G62300 AT4G17490 AT1G06160 AT5G24110 AT2G38340 AT5G64750 AT3G61630 AT1G28370 AT3G01970 AT5G64810 AT4G17500 AT5G13330 AT1G18570 AT1G75490 AT1G42990 AT1G44830 AT1G08810 AT2G40340 AT1G75390
9415	Respuesta a agua	AT3G23050 AT3G25760 AT3G19580 AT4G02380 AT2G38470 AT3G22310 AT1G27730 AT5G37500 AT1G02930 AT3G11020 AT3G50970 AT1G46768 AT1G08810 AT1G08930
6725	Proceso metabólico de compuestos aromáticos celulares	AT5G26920 AT5G24530 AT1G33030 AT1G10170 AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT4G29740 AT2G30770 AT1G72680 AT2G44490 AT5G56970 AT3G14990 AT1G18570 AT2G43820 AT4G34135 AT3G29590 AT3G13610
6979	Respuesta a estrés oxidativo	AT4G25100 AT5G20230 AT3G04120 AT1G14870 AT4G02380 AT4G08780 AT1G27730 AT2G21640 AT1G52200 AT1G02930 AT1G49570 AT1G19020 AT1G78410 AT5G59820 AT3G12580 AT2G26150
19438	Proceso biosintético de compuestos aromáticos	AT5G26920 AT5G24530 AT1G33030 AT1G10170 AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770 AT1G72680 AT3G14990 AT4G34135 AT3G29590 AT3G13610
9642	Respuesta a intensidad lumínica	AT5G20230 AT1G27730 AT4G18290 AT1G10170 AT5G59820 AT3G12580 AT2G41100 AT2G26150
9751	Respuesta a ácido salicílico	AT1G74650 AT3G09600 AT5G08790 AT1G76930 AT2G16720 AT1G18570 AT2G03760 AT1G76680 AT1G80840 AT3G52400 AT1G08810
42430	Proceso metabólico de indol y derivados	AT2G44490 AT1G18570 AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
42434	Proceso metabólico derivado del indol	AT2G44490 AT1G18570 AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770

9737	Respuesta a ácido abscísico	AT3G09600 AT3G22060 AT3G19580 AT3G26830 AT5G65310 AT5G64750 AT2G32020 AT1G27730 AT5G37500 AT1G76930 AT1G01560 AT1G18570 AT3G50970 AT1G08810 AT2G40340 AT1G08930
9814	Respuesta de defensa, interacción incompatible	AT5G26920 AT5G38900 AT1G02920 AT2G44490 AT1G06160 AT1G75040 AT3G57260 AT3G04720 AT4G12470
1666	Respuesta a hipoxia	AT2G16060 AT5G27760 AT5G63790 AT2G26150
45087	Respuesta inmune innata	AT5G26920 AT5G47220 AT1G06160 AT1G72930 AT1G57630 AT1G72940 AT3G57260 AT1G72900 AT3G04720 AT5G38900 AT1G02920 AT2G44490 AT1G75040 AT2G26560 AT4G12470
154	Modificación de rRNA	AT2G35742 AT3G47348 AT4G25631 AT2G05765 AT2G20721 AT2G20723 AT4G39366
9692	Proceso metabólico de etileno	AT1G01480 AT1G05010 AT1G73500 AT4G11280
9693	Proceso de biosíntesis de etileno	AT1G01480 AT1G05010 AT1G73500 AT4G11280
42435	Proceso biosintético derivado del indol	AT1G18570 AT3G26830 AT2G38470 AT1G73500 AT2G30770
6364	Procesamiento de rRNA	AT2G35742 AT3G47348 AT4G25631 AT4G26600 AT2G05765 AT2G20721 AT2G20723 AT4G39366
16072	Proceso metabólico de rRNA	AT2G35742 AT3G47348 AT4G25631 AT4G26600 AT2G05765 AT2G20721 AT2G20723 AT4G39366
43449	Proceso metabólico de alquenos celulares	AT1G01480 AT1G05010 AT1G73500 AT4G11280
43450	Proceso biosintético de alquenos	AT1G01480 AT1G05010 AT1G73500 AT4G11280
6955	Respuesta inmune	AT5G26920 AT5G47220 AT1G06160 AT1G72930 AT1G57630 AT1G72940 AT3G57260 AT1G72900 AT3G04720 AT5G38900 AT1G02920 AT2G44490 AT1G75040 AT2G26560 AT4G12470
46686	Respuesta al ion cadmio	AT4G25100 AT4G25200 AT4G02520 AT3G04120 AT3G09600 AT5G51830 AT5G26220 AT2G41380 AT1G02930 AT1G02920 AT3G12580 AT1G75040 AT4G37910 AT1G76680 AT2G26560
44275	Proceso catabólico de carbohidratos celulares	AT3G04120 AT5G56350 AT1G76550 AT3G14210 AT2G44490 AT3G52930 AT2G36460 AT5G55590
9723	Respuesta a etileno	AT3G09600 AT5G47220 AT4G17490 AT1G06160 AT1G18570 AT1G28370 AT1G73500 AT4G11280 AT3G04720
9733	Respuesta a auxinas	AT3G59900 AT3G09600 AT3G23050 AT1G56150 AT3G23030 AT5G57560 AT4G38840 AT1G18570 AT5G43700 AT5G13370 AT2G47000 AT4G11280 AT4G38860 AT5G54490 AT4G14560
2376	Proceso de sistema inmune	AT5G26920 AT5G47220 AT1G06160 AT1G72930 AT1G57630 AT1G72940 AT3G57260 AT1G72900 AT3G04720 AT5G38900 AT1G02920 AT2G44490 AT1G75040 AT2G26560 AT4G12470
6555	Proceso metabólico de metionina	AT2G26400 AT1G01480 AT1G05010 AT1G73500 AT4G11280
9615	Respuesta a virus	AT3G12580 AT1G75040 AT3G58350 AT2G26560 AT3G04720
103	Asimilación de sulfatos	AT1G62180 AT4G35640 AT4G21990
160	Sistema de transducción de señales de dos componentes	AT1G19050 AT5G47220 AT4G17490 AT1G06160 AT1G28370 AT1G73500

REPRIMIDOS		
9414	Respuesta a privación de agua	AT2G39800 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT5G66400 AT1G29395 AT5G15970 AT2G33380 AT4G25480 AT2G38750 AT5G59320 AT2G18050 AT2G47800 AT1G20450 AT5G58670 AT5G59220 AT4G27410 AT4G30960 AT3G02480 AT1G35720 AT5G62470 AT5G15960 AT2G38760 AT5G59310 AT3G14440 AT3G61430 AT1G20440 AT1G45249 AT2G46680 AT3G11410 AT4G34000
9415	Respuesta a agua	AT2G39800 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT5G66400 AT1G29395 AT5G15970 AT2G33380 AT4G25480 AT2G38750 AT5G59320 AT2G18050 AT2G47800 AT1G20450 AT5G58670 AT5G59220 AT4G27410 AT4G30960 AT3G02480 AT1G35720 AT5G62470 AT5G15960 AT2G38760 AT5G59310 AT3G14440 AT3G61430 AT1G20440 AT1G45249 AT2G46680 AT3G11410 AT4G34000
9628	Respuesta a estímulo abiótico	AT2G39800 AT1G29395 AT2G33380 AT2G38750 AT5G59320 AT5G38760 AT5G38420 AT5G59720 AT2G42530 AT1G20450 AT5G58670 AT3G12610 AT4G27410 AT1G15550 AT2G38760 AT1G01120 AT3G14440 AT3G61430 AT3G47340 AT2G42540 AT3G11410 AT3G50820 AT5G42900 AT3G27690 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT5G66400 AT3G01500 AT3G62410 AT5G15970 AT4G25480 AT1G16850 AT2G18050 AT2G47800 AT1G75780 AT5G39610 AT5G12250 AT5G59220 AT4G17090 AT3G08940 AT4G30960 AT2G06850 AT3G02480 AT1G35720 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT5G47370 AT5G59310 AT1G20440 AT1G13080 AT1G45249 AT2G46680 AT5G37260 AT5G58140 AT4G34000
9737	Respuesta a ácido abscísico	AT2G39800 AT5G25610 AT5G52310 AT5G66400 AT1G29395 AT5G15970 AT2G33380 AT2G38750 AT1G69260 AT5G59320 AT1G20450 AT5G58670 AT5G59220 AT4G27410 AT1G35720 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT5G59310 AT1G20440 AT1G45249 AT2G46680 AT5G37260 AT3G11410 AT4G34000
9409	Respuesta a frío	AT4G17090 AT5G52310 AT5G66400 AT1G29395 AT1G35720 AT3G01500 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT4G25480 AT2G38750 AT2G38760 AT1G01120 AT5G12250 AT2G42530 AT1G20440 AT1G20450 AT2G42540 AT5G58670 AT3G11410 AT5G42900
42221	Respuesta a estímulo químico	AT2G39800 AT1G56010 AT5G54510 AT1G29395 AT2G33380 AT3G05800 AT2G38750 AT5G59320 AT5G59720 AT1G80760 AT1G20450 AT5G58670 AT5G03840 AT3G12610 AT4G27410 AT1G15550 AT2G38760 AT3G14440 AT3G18000 AT3G61430 AT5G58080 AT3G47340 AT4G33010 AT2G24210 AT3G11410 AT2G47750 AT5G25610 AT5G40890 AT3G53420 AT5G52310 AT5G66400 AT3G01500 AT3G62410 AT5G15970 AT3G22200 AT4G25480 AT1G69260 AT5G07460 AT2G18050 AT2G47800 AT5G39610 AT1G54040 AT5G59220 AT4G30960 AT3G01190 AT2G06850 AT3G02480 AT1G35720 AT1G64380 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT1G11210 AT5G47370 AT5G59310 AT1G20440 AT1G45249 AT2G46680 AT5G37260 AT4G34000
9631	Aclimatación al frío	AT5G66400 AT1G29395 AT1G20440 AT5G15960 AT4G25480 AT1G20450 AT2G42540
9266	Respuesta a temperatura	AT4G17090 AT5G52310 AT5G66400 AT1G29395 AT1G35720 AT3G01500 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT4G25480 AT2G38750 AT2G38760 AT1G01120 AT5G59720 AT5G12250 AT2G42530 AT1G20440 AT1G20450 AT1G13080 AT2G42540 AT5G58670 AT3G11410 AT5G42900
9719	Respuesta a estímulo endógeno	AT2G39800 AT5G25610 AT1G56010 AT5G52310 AT5G54510 AT5G66400 AT1G29395 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT2G38750 AT1G69260 AT5G59320 AT1G54040 AT1G20450 AT5G58670 AT5G59220 AT4G27410 AT1G15550 AT2G06850 AT1G35720 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT5G47370 AT5G59310 AT5G58080 AT1G20440 AT1G45249 AT2G46680 AT2G24210 AT5G37260 AT3G11410 AT2G47750 AT4G34000
9725	Respuesta a hormonas	AT2G39800 AT5G25610 AT1G56010 AT5G52310 AT5G54510 AT5G66400 AT1G29395 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT2G38750 AT1G69260 AT5G59320 AT1G20450 AT5G58670 AT5G59220 AT4G27410 AT1G15550 AT2G06850 AT1G35720 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT5G59310 AT5G58080 AT1G20440 AT1G45249 AT2G46680 AT5G37260 AT3G11410 AT2G47750 AT4G34000
6970	Respuesta a estrés osmótico	AT2G39800 AT5G25610 AT4G30960 AT5G52310 AT1G35720 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT1G16850 AT2G38750 AT2G38760 AT5G39610 AT3G14440 AT5G12250 AT1G20440 AT1G45249 AT2G42540 AT5G58670 AT5G37260 AT4G34000
10033	Respuesta a sustancia organica	AT2G39800 AT5G25610 AT1G56010 AT5G52310 AT5G54510 AT5G66400 AT1G29395 AT3G62410 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT3G22200 AT2G38750 AT1G69260 AT5G59320 AT1G54040 AT1G20450 AT5G58670 AT5G03840 AT5G59220 AT4G27410 AT1G15550 AT2G06850 AT1G35720 AT1G64380 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT5G47370 AT5G59310 AT5G58080 AT1G20440 AT3G47340 AT1G45249 AT2G46680 AT2G24210 AT5G37260 AT3G11410 AT2G47750 AT4G34000
50896	Respuesta a estímulo	AT2G39800 AT1G56010 AT5G25110 AT5G54510 AT1G29395 AT3G23430 AT2G33380 AT3G05800 AT5G14740 AT2G38750 AT5G59320 AT1G71040 AT5G53660 AT5G38420 AT5G59720 AT1G80760 AT2G42530 AT1G20450 AT5G58670 AT5G03840 AT3G12610 AT4G27410 AT1G15550 AT2G38760 AT1G01120 AT3G14440 AT3G18000 AT3G61430 AT5G58080 AT3G47340 AT4G33010 AT2G24210 AT2G42540 AT3G11410 AT2G47750 AT3G50820 AT5G42900 AT3G27690 AT5G25610 AT5G40890 AT3G53420 AT5G52310 AT5G66400 AT3G01500 AT3G62410 AT5G15970 AT3G22200 AT4G25480 AT1G16850 AT5G45380 AT1G69260 AT5G07460 AT3G20820 AT1G73680 AT2G18050 AT2G47800 AT1G75780 AT5G39610 AT5G57685 AT5G12250 AT1G54040 AT1G51090 AT5G59220 AT4G17090 AT3G08940 AT4G30960 AT3G01190 AT2G06850 AT3G02480 AT1G35720 AT1G64380 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT1G11210 AT5G47370 AT5G59310 AT5G02140 AT1G20440 AT1G13080 AT3G13650 AT1G45249 AT2G46680 AT5G37260 AT1G20840 AT5G58140 AT3G17810 AT4G34000
6950	Respuesta a estrés	AT2G39800 AT5G25110 AT1G29395 AT3G23430 AT2G33380 AT5G14740 AT2G38750 AT5G59320 AT1G71040 AT5G59720 AT2G42530 AT1G20450 AT5G58670 AT4G27410 AT2G38760 AT1G01120 AT3G14440 AT3G61430 AT3G47340 AT2G24210 AT2G42540 AT3G11410 AT5G42900 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT5G66400 AT3G01500 AT5G15970 AT3G22200 AT4G25480 AT1G16850 AT5G45380 AT5G07460 AT3G20820 AT2G18050 AT2G47800 AT5G39610 AT5G12250 AT1G54040 AT1G51090 AT5G59220 AT4G17090 AT4G30960 AT3G01190 AT2G06850 AT3G02480 AT1G35720 AT5G62470 AT4G01060 AT5G15960 AT1G11210 AT5G59310 AT1G20440 AT1G13080 AT3G13650 AT1G45249 AT2G46680 AT5G37260 AT4G34000

9828	Debilitamiento de la pared celular vegetal	AT3G55500 AT3G45970 AT2G40610 AT2G20750 AT4G28250 AT5G05290 AT4G38400
60560	Desarrollo del crecimiento implicado en la morfogénesis	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
9826	Crecimiento celular unidimensional	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
9827	Modificación de la pared celular vegetal	AT3G55500 AT3G45970 AT2G40610 AT2G20750 AT4G28250 AT5G05290 AT4G38400
9651	Respuesta a estrés salino	AT2G39800 AT5G25610 AT4G30960 AT5G52310 AT1G35720 AT5G62470 AT4G01060 AT2G33380 AT1G16850 AT2G38750 AT2G38760 AT5G39610 AT3G14440 AT5G12250 AT1G45249 AT5G58670 AT5G37260 AT4G34000
48589	Desarrollo del crecimiento	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
16049	Crecimiento celular	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT1G69490 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
42545	Modificación de la pared celular vegetal	AT5G53370 AT3G55500 AT3G45970 AT2G40610 AT3G49220 AT2G20750 AT3G47400 AT4G28250 AT5G05290 AT4G38400
8361	Regulación del tamaño celular	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT1G69490 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
32535	Regulación del tamaño de componentes celulares	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT1G69490 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
90066	Regulación del tamaño de la estructura anatómica	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT1G69490 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
902	Morfogénesis celular	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
9269	Respuesta a desecación	AT2G39800 AT5G25610 AT5G52310 AT2G33380
9738	Vía de señalización mediada por ácido abscísico	AT1G45249 AT2G46680 AT5G58670 AT3G11410 AT1G69260 AT4G34000
71215	Respuesta celular al estímulo del ácido abscísico	AT1G45249 AT2G46680 AT5G58670 AT3G11410 AT1G69260 AT4G34000
40007	Crecimiento	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT1G69490 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
9664	Organización de la pared celular vegetal	AT3G55500 AT3G45970 AT2G40610 AT2G20750 AT4G28250 AT5G05290 AT4G38400
9755	Vía de señalización mediada por hormonas	AT1G15550 AT1G56010 AT5G54510 AT5G58080 AT3G05800 AT1G45249 AT2G46680 AT5G58670 AT3G11410 AT5G47370 AT1G69260 AT4G34000
32989	Morfogénesis del componente celular	AT3G55500 AT2G40610 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
32870	Respuesta celular al estímulo hormonal	AT1G15550 AT1G56010 AT5G54510 AT5G58080 AT3G05800 AT1G45249 AT2G46680 AT5G58670 AT3G11410 AT5G47370 AT1G69260 AT4G34000
71555	Organización de la pared celular	AT5G53370 AT3G55500 AT3G45970 AT2G40610 AT3G49220 AT2G20750 AT3G47400 AT4G28250 AT5G05290 AT4G38400
10150	Senescencia de hojas	AT1G69490 AT1G73680 AT5G39610 AT1G54040

71495	Respuesta celular a estímulo endógeno	AT1G15550 AT1G56010 AT5G54510 AT5G58080 AT3G05800 AT1G45249 AT2G46680 AT5G58670 AT3G11410 AT5G47370 AT1G69260 AT4G34000
10260	Senescencia de órganos	AT1G69490 AT1G73680 AT5G39610 AT1G54040
15698	Transporte de aniones inorgánicos	AT1G69870 AT5G40890 AT3G23430 AT1G23090 AT2G25680
5975	Proceso metabólico de carbohidratos	AT4G26530 AT4G24010 AT2G32990 AT2G32530 AT4G27480 AT3G62410 AT3G58790 AT1G13700 AT1G35910 AT3G19620 AT3G62750 AT4G37800 AT1G54040 AT4G11050 AT4G17090 AT1G62540 AT1G78090 AT2G32540 AT1G12240 AT1G13130 AT1G62660 AT3G62740 AT4G34480 AT1G26560 AT4G39770
6949	Formación del sincitio	AT3G55500 AT2G40610 AT4G28250
16051	Proceso de biosíntesis de carbohidratos	AT4G24010 AT4G17090 AT1G62540 AT1G78090 AT2G32540 AT2G32530 AT4G27480 AT3G62410 AT3G58790 AT4G39770 AT1G35910
71669	Organización o biogénesis de la pared celular de tipo vegetal	AT3G55500 AT3G45970 AT2G40610 AT2G20750 AT2G35700 AT4G28250 AT5G05290 AT4G38400
9605	Respuesta a estímulo externo	AT1G71040 AT2G06850 AT3G18000 AT1G80760 AT1G29395 AT3G23430 AT3G47340 AT3G22200 AT5G45380 AT5G58140 AT3G17810
9416	Respuesta a estímulo lumínico	AT3G08940 AT3G27690 AT1G15550 AT2G06850 AT3G62410 AT5G15960 AT5G47370 AT1G01120 AT1G75780 AT5G53660 AT5G38420 AT5G59720 AT3G47340 AT2G42540 AT3G50820 AT3G12610 AT5G58140
46351	Proceso biosintético de disacáridos	AT4G17090 AT1G78090 AT4G39770 AT1G35910
10114	Respuesta a luz roja	AT3G08940 AT3G27690 AT1G15550 AT5G53660 AT5G38420
10286	Aclimatación al calor	AT5G59720 AT1G20440 AT1G13080
9314	Respuesta a radiación	AT3G08940 AT3G27690 AT1G15550 AT2G06850 AT3G62410 AT5G15960 AT5G47370 AT1G01120 AT1G75780 AT5G53660 AT5G38420 AT5G59720 AT3G47340 AT2G42540 AT3G50820 AT3G12610 AT5G58140
9653	Morfogénesis estructura anatómica	AT2G26170 AT3G55500 AT1G20700 AT2G40610 AT2G06850 AT1G56010 AT5G54510 AT4G28250 AT4G09820 AT4G01060 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT4G38400
9312	Proceso biosintético de oligosacáridos	AT4G17090 AT1G78090 AT4G39770 AT1G35910
70887	Respuesta celular al estímulo químico	AT1G15550 AT1G56010 AT5G54510 AT1G29395 AT3G05800 AT5G47370 AT1G69260 AT1G80760 AT5G58080 AT1G45249 AT2G46680 AT5G58670 AT3G11410 AT4G34000
65008	Regulación de la calidad biológica	AT2G26170 AT3G55500 AT2G40610 AT4G30960 AT2G06850 AT5G54510 AT4G28250 AT3G22200 AT5G05290 AT5G47370 AT1G69490 AT3G45970 AT1G75780 AT2G20750 AT3G18000 AT1G28230 AT1G08980 AT3G09390 AT4G38400

ANEXO VII. Categorías GO de DEGs inducidos en HB21ind y reprimidos en AP2ind		
ID GO	Descripción GO	Genes
9414	Respuesta a privación de agua	AT2G39800 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT3G02480 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT4G25480 AT2G18050 AT3G14440 AT5G58670 AT4G34000
9415	Respuesta a agua	AT2G39800 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT3G02480 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT4G25480 AT2G18050 AT3G14440 AT5G58670 AT4G34000
9628	Respuesta a estrés abiótico	AT2G39800 AT3G08940 AT3G27690 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT3G02480 AT3G62410 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT4G25480 AT2G18050 AT5G53660 AT3G14440 AT2G42530 AT3G47340 AT5G58670 AT2G42540 AT3G50820 AT4G34000
50896	Respuesta a estímulo	AT2G39800 AT3G27690 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT5G54510 AT3G62410 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT5G14740 AT4G25480 AT1G71040 AT2G18050 AT5G53660 AT2G42530 AT5G58670 AT5G03840 AT3G08940 AT3G02480 AT5G15960 AT1G11210 AT3G14440 AT3G47340 AT2G42540 AT3G50820 AT2G47750 AT4G34000
42221	Respuesta a estímulo químico	AT2G39800 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT3G02480 AT5G54510 AT3G62410 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT5G15960 AT4G25480 AT1G11210 AT2G18050 AT3G14440 AT3G47340 AT5G58670 AT5G03840 AT2G47750 AT4G34000
9269	Respuesta a desecación	AT2G39800 AT5G25610 AT5G52310 AT2G33380
6970	Respuesta a estrés osmótico	AT2G39800 AT5G25610 AT3G14440 AT5G52310 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT5G58670 AT2G42540 AT4G34000
9409	Respuesta a frío	AT5G52310 AT5G15970 AT2G33380 AT2G42530 AT5G15960 AT4G25480 AT5G58670 AT2G42540
6950	Respuesta a estrés	AT2G39800 AT5G25610 AT3G53420 AT5G52310 AT3G02480 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT5G14740 AT4G25480 AT1G11210 AT1G71040 AT2G18050 AT3G14440 AT2G42530 AT3G47340 AT5G58670 AT2G42540 AT4G34000
9737	Respuesta a ácido abscísico	AT2G39800 AT5G25610 AT5G52310 AT5G15970 AT2G33380 AT5G15960 AT5G58670 AT4G34000
10033	Respuesta a sustancia orgánica	AT2G39800 AT5G25610 AT5G52310 AT5G54510 AT3G62410 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT5G15960 AT3G47340 AT5G58670 AT5G03840 AT2G47750 AT4G34000
9266	Respuesta a temperatura	AT5G52310 AT5G15970 AT2G33380 AT2G42530 AT5G15960 AT4G25480 AT5G58670 AT2G42540
9725	Respuesta a hormona	AT2G39800 AT5G25610 AT5G52310 AT5G54510 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT5G15960 AT5G58670 AT2G47750 AT4G34000
9631	Aclimatación al frío	AT5G15960 AT4G25480 AT2G42540
9719	Respuesta a estímulo endógeno	AT2G39800 AT5G25610 AT5G52310 AT5G54510 AT5G15970 AT2G33380 AT3G05800 AT5G15960 AT5G58670 AT2G47750 AT4G34000
9416	Respuesta a estímulo lumínico	AT3G08940 AT3G27690 AT5G53660 AT3G62410 AT3G47340 AT5G15960 AT2G42540 AT3G50820
9314	Respuesta a radiación	AT3G08940 AT3G27690 AT5G53660 AT3G62410 AT3G47340 AT5G15960 AT2G42540 AT3G50820
9651	Respuesta a estrés salino	AT2G39800 AT5G25610 AT3G14440 AT5G52310 AT2G33380 AT5G58670 AT4G34000
9639	Respuesta a luz roja o roja lejana	AT3G08940 AT3G27690 AT5G53660 AT5G15960 AT2G42540
9744	Respuesta a sacarosa	AT3G62410 AT3G47340 AT5G03840

34285	Respuesta a disacáridos	AT3G62410 AT3G47340 AT5G03840
10218	Respuesta a luz lejana	AT3G08940 AT3G27690 AT5G53660
42538	Respuesta de salinidad hiperosmótica	AT2G39800 AT3G14440 AT5G52310
15979	Fotosíntesis	AT2G34430 AT3G27690 AT3G62410 AT3G50820
6972	Respuesta hiperosmótica	AT2G39800 AT3G14440 AT5G52310
10114	Respuesta a luz roja	AT3G08940 AT3G27690 AT5G53660
44282	Proceso catabólico de molécula pequeña	AT4G26530 AT3G47340 AT1G13700 AT1G78440
51716	Respuesta celular a estímulo	AT1G71040 AT5G54510 AT3G05800 AT3G47340 AT5G15960 AT5G58670 AT2G42540 AT4G34000
43617	Respuesta celular a inanición de sacarosa	AT3G47340
18149	Entrecruzamiento de péptidos	AT3G62410
90344	Regulación negativa del envejecimiento celular	AT5G03840
18198	Modificación de peptidil-cisteína	AT3G62410
18316	Entrecruzamiento de péptidos a través de L-cistina	AT3G62410
6649	Transferencia de fosfolípidos a la membrana	AT2G38530
9853	Fotorespiración	AT1G68010 AT2G13360

ANEXO VIII. ABREVIATURAS

#: Número	LB: medio Luria-Bertani.
%: por ciento	Ler: ecotipo Landsberg.
µg/L: microgramos por litro	m: metros.
ABA: ácido abscísico	M: molar.
AP2: APETALA2	MES: ácido 4-morfolino-etano-sulfónico.
Arabidopsis: Arabidopsis thaliana	mg: miligramos.
Basta: glufosinato de amonio.	MI: meristemo indeterminado inflorescente
CaMV 35S: promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.	min: minutos.
cDNA: DNA complementario.	miR156: microRNA 156
ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina (<i>Chromatine Immuno Precipitation</i>)	miR172: microRNA 172
CLV: CLAVATA	miRNA: microRNA
cm: centímetros.	ml: mililitros.
Col-0: ecotipo Columbia.	mm: milímetros.
Cys: cisteína	mM: milimolar.
DEG: genes diferencialmente expresados (<i>Different Expressed Genes</i>)	mRNA: RNA mensajero
Dexa: dexametasona	MS: medio de Murashige y Skoog.
DNA: ácido desoxirribonucleico.	NCED: 9-CIS-EPOXICAROTENOIR DIOXIGENASE
DNasa: desoxirribonucleasa	ng: nanogramos.
dNTP: desoxinucleósidos trifosfato.	nM: nanomolar.
EDTA: etilen-diamino-tetraacetato sódico.	nm: nanomoles.
EMS: etilmetanosulfonato.	°C: grados centígrados
et al.: y otros.	padj: p-value ajustado
FC: tasa de cambio (<i>fold change</i>)	pág.: página.
Fig.: figura.	pb: pares de bases.
FT: FLOWERING LOCUS T	PCR: reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
FUL: FRUITFUL	qRT-PCR: PCR cuantitativa a tiempo real.
g/L: gramos por litro	RNA: ácido ribonucleico
g: gramos.	RNA_m: ARN mensajero.
GFP: proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>).	RNasa: ribonucleasa
GPA: Parada global de la proliferación (<i>Global proliferative arrest</i>)	rpm: revoluciones por minuto.
h: horas	SAM: meristemo apical del tallo (<i>Shoot Apical Meristem</i>)
His: histidina	sda: semanas después del alzado
Ind: inducible	seg.: segundos.
Kan: kanamicina	sgRNA: ARN de guía única
kb: kilobases.	SPL: SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE
lacZ: β-galactosidasa.	STM: SHOOTMERISTEMLESS
	SVP: SHORT VEGETATIVE PHASE

TBE: Tris-borato-EDTA.

TOE: TARGET OF EAT

UTR: región no traducida (*untranslated región*)

v/v: volumen por volumen

W: vatio

WUS: WUSCHEL

YFP: proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein)

µg: microgramos

µl: microlitros

µM: micromola