



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL

Estudio de redes genéticas que regulan la floración en variedades locales de trigo españolas

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor/a: Paula Rodríguez de Juan

Tutor/a: María Estela Giménez Caminero

Cotutor/a: José Guadalupe Vázquez García

Julio de 2025



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE REDES GENÉTICAS QUE REGULAN LA FLORACIÓN EN
VARIEDADES LOCALES DE TRIGO ESPAÑOLAS**

TRABAJO FIN DE GRADO

Paula Rodríguez de Juan

MADRID, 2025

Tutor: María Estela Giménez Caminero

Cotutor: José Guadalupe Vázquez García

**Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal, Universidad Politécnica de
Madrid**



POLITÉCNICA



ESTUDIO DE REDES GENÉTICAS QUE REGULAN LA FLORACIÓN EN VARIEDADES LOCALES DE TRIGO ESPAÑOLAS

**Memoria presentada por Paula Rodríguez de Juan para la obtención
del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica
de Madrid**

Fdo: Paula Rodríguez de Juan

VºBº Tutora y Codirectora del TFG

María Estela Giménez Caminero

Dpto. de Biotecnología y Biología Vegetal

ETSIAAB – Universidad Politécnica de Madrid

VºBº Cotutor y Codirector del TFG

José Guadalupe Vázquez García

Dpto. de Biotecnología y Biología Vegetal

ETSIAAB – Universidad Politécnica de Madrid

Madrid, 7 de julio de 2025

A mis padres, por su apoyo y por enseñarme, casi sin darse cuenta, cuál era mi vocación.

Y a mis amigos, por ser capaces de dar la vuelta a momentos de estrés y convertirlos en algo compartido, e incluso divertido.

*Quiero expresar mi agradecimiento a mis tutores, Estela y José Guadalupe,
por su dedicación y apoyo constante durante la realización de este trabajo.
Y al Departamento de Mejora Genética de Plantas por su acogida.*

Índice

Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras.....	vi
Abreviaturas.....	vii
Resumen.....	viii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
EL TRIGO.....	1
PROCESO DE FLORACIÓN EN TRIGO.....	2
BASES GENÉTICAS QUE INTERVIENEN EN LA FLORACIÓN DE <i>TRITICUM AESTIVUM</i>	
L.....	2
GRUPOS GÉNICOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA FLORACIÓN.....	3
VARIETADES LOCALES Y MEJORA GENÉTICA.....	5
OBJETIVOS.....	6
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
MATERIAL VEGETAL.....	7
FENOTIPADO.....	7
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN.....	8
<i>Recolección de material vegetal</i>	8
<i>Extracción de ARN</i>	9
<i>Tratamiento de ADNasas</i>	9
<i>Síntesis de ADNc</i>	9
<i>Búsqueda de cebadores</i>	9
<i>PCR cuantitativa (qPCR)</i>	10
<i>Análisis de datos</i>	11
ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DE <i>VRN2</i>	11
<i>Extracción de ADN</i>	11
<i>Diseño de cebadores</i>	11
<i>Secuenciación de VRN2</i>	12
GENOTIPADO DEL GEN HOMEÓLOGO <i>VRN1-D</i> MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN PCR	
.....	13
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	15
VARIABILIDAD EN EL TIEMPO DE FLORACIÓN EN VARIETADES LOCALES ESPAÑOLAS.....	15
VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS VARIETADES LOCALES ESPAÑOLAS.....	15
SECUENCIACIÓN DE <i>VRN2</i>	17
CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	18
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	21
EFECTO DE LA VARIABILIDAD ALÉLICA EN LA REGULACIÓN DE LA FLORACIÓN.....	21
EFECTO DE LA VARIABILIDAD ALÉLICA DE <i>VRN2</i> EN EL TIEMPO DE FLORACIÓN.....	22
EFECTO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE FLORACIÓN EN EL TIEMPO DE FLORACIÓN.....	24
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	26
CONCLUSIONES.....	26
FUTUROS PASOS.....	26
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA.....	28

Índice de tablas

TABLA 1 CEBADORES PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ESTUDIO.....	10
TABLA 2 CEBADORES PARA SECUENCIAR EL GEN <i>VRN2</i>	13
TABLA 3 MARCADORES MOLECULARES PARA EL GEN <i>VRN1D</i>	13
TABLA 4 REGISTRO DE DÍAS ENTRE LA COSECHA Y EL DÍA DE ESPIGADO (DE).....	15
TABLA 5 ALELOS DEL GEN <i>VRN1</i> Y <i>PPDI</i> PRESENTES EN LAS DISTINTAS VARIEDADES.....	16
TABLA 6 ESTUDIO DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN Y LA MANIFESTACIÓN FENOTÍPICA.	18

Índice de figuras

FIGURA 1: EVOLUCIÓN DEL TRIGO.....	1
FIGURA 2: RED GENÉTICA ENCARGADA DE REGULAR LA INDUCCIÓN DE LA FLORACIÓN	3
FIGURA 3: ESQUEMA DE LA PARCELA DE SIEMBRA Y LA OBTENCIÓN DE RÉPLICAS BIOLÓGICAS	7
FIGURA 4: DÍA DE ESPIGADO DÍA DE ANTESIS	8
FIGURA 5: DÍA DE ANTESIS	8
FIGURA 6: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA POSICIÓN DE LOS CEBADORES SOLAPANTES DISEÑADOS PARA SECUENCIA EL GEN <i>VRN2</i>	12
FIGURA 7: ALINEACIÓN DE SECUENCIAS CORRESPONDIENTES AL EXÓN 1 DE <i>VRN2A</i>	17
FIGURA 8: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DEL GEN <i>VRN2B</i>	18
FIGURA 9 EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES DE FLORACIÓN EN VARIEDADES LOCALES ESPAÑOLAS. ..	20

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AP1	APETALA1
AP2L	APETALA2-LIKE
ADNc	ADN complementario
CO1/CO2	<i>CONSTANS</i> 1 y 2
CS	Chinese Spring
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DE	Día de Espigado
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
FLC	Flowering Locus C (inhibidor de floración)
FUL2/FUL3	<i>FRUITFULL</i>
GI	<i>GIGANTEA</i>
InDel	Inserción-delección
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPD1	PHOTOPERIOD 1
PRR	Pseudo Response Regulator
qPCR	PCR cuantitativa
r_s	Coefficiente de Spearman
SNP	Single Nucleotide Polimorphism
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TA	Temperatura ambiente
VRN1/VRN2/VRN3	Genes de Vernalización

Resumen

La floración es un proceso determinante en el ciclo de vida del trigo (*Triticum aestivum* L.) con impacto directo en su capacidad adaptativa y en el rendimiento del cultivo. Este proceso está regulado por una red genética dependiente de señales ambientales como el frío (vernalización) y la duración del día (fotoperiodo). Los genes principales involucrados en estas rutas reguladoras son *VRN1*, *VRN2*, *VRN3* y *PHOTOPERIOD 1 (PPD1)*, acompañados de otros genes con funciones complementarias.

Se evaluaron 16 variedades locales españolas de trigo con el objetivo de estudiar la vía genética que regula el proceso de floración. Estas variedades fueron evaluadas fenológicamente y se realizaron estudios de genotipado, secuenciación y análisis de expresión de los genes implicados en la ruta reguladora. Los resultados evidenciaron variabilidad alélica en el gen *VRN1* y su efecto en el tiempo de floración. Así mismo, se identificaron polimorfismos en el gen *VRN2*, como SNPs e Indels (inserción/delección). Dicha variabilidad será de gran utilidad en el estudio de asociación fenotipo-genotipo que permita determinar el efecto de cada gen sobre la floración. Además, estudios de asociación de expresión y fenotipo han determinado relación nivel de expresión y tiempo de floración en genes como *VRN3*.

Los resultados obtenidos aportan información útil para determinar posibles dianas en futuros proyectos de mejora vegetal cuyo objetivo sea maximizar la adaptabilidad del cultivo a condiciones climáticas cambiantes.

Abstract

Flowering is a key process in the life cycle of wheat (*Triticum aestivum* L.) with a direct impact on its adaptive capacity and crop yield. This process is regulated by a genetic network influenced by environmental signals such as cold (vernalization) and day length (photoperiod). The main genes involved in these regulatory pathways are *VRN1*, *VRN2*, *VRN3*, and *PHOTOPERIOD 1 (PPD1)*, along with other genes with complementary functions.

Sixteen local Spanish wheat varieties were evaluated to study the genetic pathway that regulates the flowering process. These varieties were assessed phenologically, and genotyping, sequencing, and gene expression analyses were conducted for the genes involved in the regulatory pathway. The results showed allelic variability in the *VRN1* gene and its effect on flowering time. Additionally, polymorphisms such as SNPs and Indels (insertions/deletions) were identified in the *VRN2* gene. This variability will be highly valuable for phenotype-genotype association studies aimed at determining the effect of each gene on flowering.

Moreover, expression-phenotype association studies revealed a relationship between expression levels and flowering time in genes such as *VRN3*.

The results obtained provide useful information for identifying potential targets in future plant breeding projects aimed at maximizing crop adaptability to changing climatic conditions.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. El trigo.

Triticum aestivum L., comúnmente conocido como trigo blando o trigo panadero, es una gramínea de ciclo anual y reproducción autógama perteneciente a la familia *Poaceae* (denominada asimismo *Gramineae*). Se trata de una especie alohexaploide ($2n=6x=42$, AABBDD) cuya evolución y domesticación comenzó en el Creciente Fértil (A. A. Levy & Feldman, 2022) (Figura 1). *Triticum urartu*, una especie diploide silvestre (genomio AA), hibridó con un pariente silvestre del género *Aegilops* (genomio BB), obteniendo así *Triticum dicoccoides* (trigo emmer), la cual es una especie tetraploide (AABB) considerada el ancestro directo de las variedades más empleadas en la actualidad (trigo duro y blando) (A. A. Levy & Feldman, 2022; Peng et al., 2011). Mientras que *Triticum durum* (empleado para pasta), nació de una serie de mutaciones que se dieron en el trigo emmer (Sall et al., 2019), el trigo blando (*Triticum aestivum*) fue fruto del cruzamiento entre *T. dicoccoides* (AABB) y *Aegilops tauschii* (genomio DD) (Peng et al., 2011). Como consecuencia, el genoma del trigo blando consta de tres subgenomas homeólogos (A, B y D), cada uno derivado de un ancestro (Figura 1) (Appels et al., 2018).

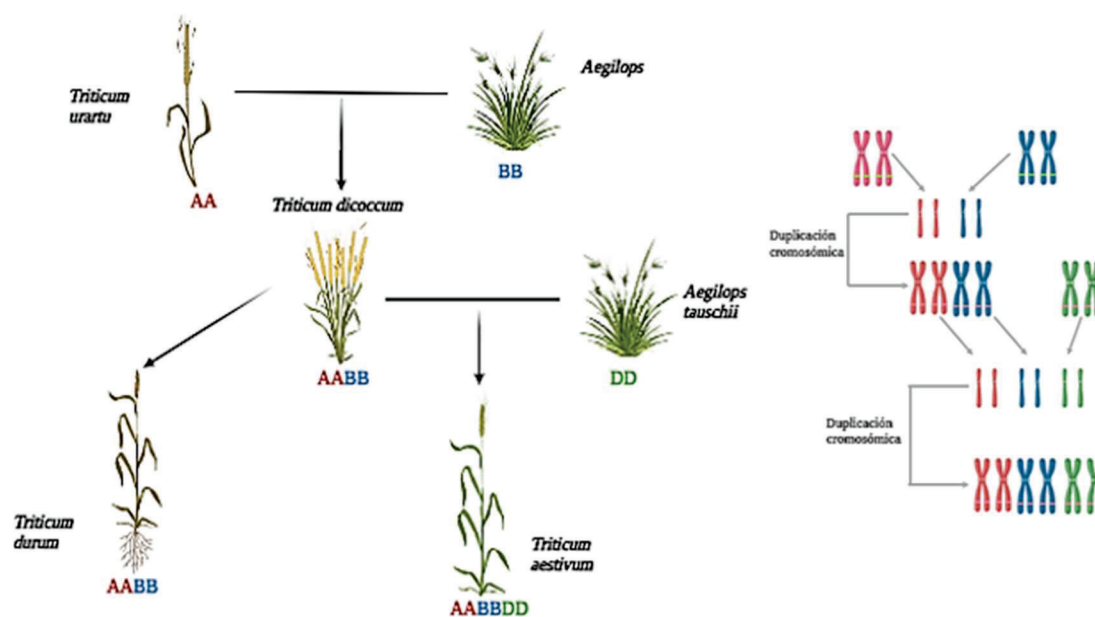


Figura 1: Evolución del trigo. Adaptado de Kellog et al. (2003) y Peng et al. (2011)

El trigo blando es un alimento básico, fuente de fibra, proteína, carbohidrato y vitaminas (Ficco & Borrelli, 2023). Representa un 20% de las calorías y proteínas consumidas a nivel mundial, lo que lo convierte en una herramienta esencial para alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria (Shiferaw et al., 2013). Tal es su relevancia que, debido al rápido crecimiento de la población, se prevé un aumento de la demanda de un 60% para el año 2050 (Tadesse et al., 2017). Sumado a ello, el escenario agrícola actual debe enfrentar un reto de gran envergadura: el cambio climático.

La variación de la temperatura afecta de forma directa a la producción agrícola, ya que altera los ciclos de crecimiento de los cultivos y acelera la proliferación de plagas y la degradación de los agroecosistemas (FAO, 2015).

1.2. Proceso de floración en trigo.

Un prerrequisito para la producción de trigo es la transición del desarrollo vegetativo a reproductivo y el llenado del grano. Dichos procesos están firmemente regulados por mecanismos moleculares que responden tanto a estímulos endógenos como ambientales, lo cual genera una enorme plasticidad en el proceso de floración que asegura que el desarrollo floral solo ocurra en condiciones óptimas (Hill & Li, 2016). El momento en el que ocurre la floración afecta directamente al rendimiento del grano, por lo que debe ocurrir durante una estación específica para evitar estreses tanto abióticos (frío, heladas, calor, sequías, etc.) como bióticos (hongos, bacterias, virus, nematodos o insectos). La floración en invierno puede conllevar daños por congelación en las estructuras florales y la falta de radiación solar puede provocar reducción en la producción (Dreccer et al., 2018). Por el contrario, si la floración se da demasiado tarde, en condiciones de temperaturas elevadas y sequía, el calor y la limitación hídrica puede disminuir la producción (Flohr et al., 2017).

En este contexto, la capacidad de adaptación de los cultivos a distintos ambientes, y del trigo en particular, se debe fundamentalmente a los genes que regulan la floración a través de la respuesta a la vernalización y fotoperiodo. Ambas características tienen gran importancia agronómica, ya que aseguran que la floración se lleve a cabo en el momento adecuado (Gómez et al., 2014). En particular, la expansión del trigo está asociada a la explotación de la variación natural en los genes de sensibilidad al fotoperiodo y la respuesta a vernalización (Hill & Li, 2016).

Comprender las bases genéticas de la variación fenotípica y de otros caracteres adaptativos puede ayudar a diseñar estrategias de mejora, contribuir a predecir riesgos en la producción y, por tanto, mejorar el manejo de cultivo. Los genes que controlan en mayor medida la fenología son aquellos relacionados con requerimientos de vernalización y sensibilidad al fotoperiodo.

1.3. Bases genéticas que intervienen en la floración de *Triticum aestivum* L.

En el trigo, como en otros cereales, la floración está controlada por vernalización, fotoperiodo y, en menor medida, por factores internos de desarrollo (precocidad intrínseca) (Herndl et al., 2008). Estas vías de regulación no son independientes entre sí, sino que interaccionan entre ellas y componen una red genética compleja.

La vernalización es un proceso por el cual la planta debe estar expuesta a bajas temperaturas durante un tiempo determinado para poder inducir la floración. El propósito de este mecanismo es asegurar que las flores en desarrollo no sean dañadas por frío (Kim et al., 2009). Según los

requerimientos de vernalización, los trigos se diferencian en dos clases: las variedades de invierno, que requieren de una exposición prolongada a frío, y las variedades de primavera, que son capaces de florecer sin necesidad de bajas temperaturas (J. Levy & Peterson, 1972; Ma et al., 2022).

Respecto al fotoperiodo, las plantas determinan el momento de floración en función de la duración del día, es decir, en función de las proporciones de luz y oscuridad que tienen lugar en un ciclo diario de 24 horas (circadiano) (Szűcs et al., 2006). Atendiendo a su respuesta a fotoperiodo, también se distinguen dos clases de plantas: sensibles (comúnmente conocidas como “de día largo”) e insensibles a fotoperiodo (“de día corto”).

La ruta de la precocidad per se (también conocida como ruta dependiente de la edad), está relacionada con el desarrollo interno de la planta. Es independiente a estímulos ambientales, y es un rasgo altamente heredable (Kato & Wada, 1999).

1.4. Grupos génicos involucrados en la regulación de la floración.

El proceso de vernalización está principalmente regulado por tres grupos de genes según la vía de regulación en la que participan (Figura 2).

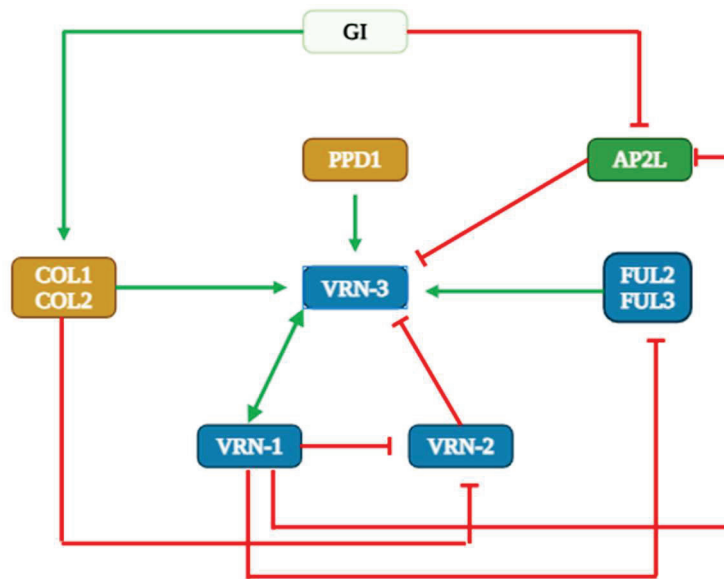


Figura 2: Red genética encargada de regular la inducción de la floración. Esquema diseñado a partir de la bibliografía consultada. Genes: relacionados con vernalización (azul), fotoperiodo (amarillo) y precocidad (verde). Flechas: inhibición (rojo) y activación (verde)

El locus *VRN-1* codifica para un factor de transcripción MADS-box, ortólogo al gen *APETALA1* (*AP1*) de *Arabidopsis*, cuya función principal es la regulación de la transición floral, es decir, el cambio de la fase vegetativa a la fase reproductiva (Distelfeld, Tranquilli, et al., 2009). Por otro

lado, el gen de vernalización *VRN-3* es el ortólogo del gen de *Arabidopsis* *FLOWERING LOCUS T (FT)*, el inductor floral. (Yan et al., 2006).

El gen *VRN-2*, también conocido como *ZCCT1*, tiene una función análoga al gen MADS-box Flowering Locus C (*FLC*) de *Arabidopsis*. Ambos son represores dominantes de la floración a través de la vernalización a pesar de que pertenecen a familias de factores de transcripción distintas. El gen *VRN-2* actúa como represor transcripcional de los genes *VRN-1* y *VRN-3*, reprimiendo la floración (Distelfeld, Tranquilli, et al., 2009; Dubcovsky et al., 2006a; Yan, Loukoianov, et al., 2004a).

Antes de la vernalización, *VRN-3* es reprimido por *VRN-2*. Únicamente cuando se ha cumplido el requerimiento de vernalización, se inhibe *VRN2* (Yan, Loukoianov, et al., 2004a); sin embargo, esta inhibición de *VRN-2* solo conlleva un aumento de la expresión de los genes *VRN-1* y *VRN-3* para permitir la floración cuando se suman también las condiciones de día largo (Dubcovsky et al., 2006b). Durante este proceso, *VRN-1* inhibe *VRN-2* para estabilizar la activación de *VRN-3* y *VRN-3* activa la transcripción de *VRN-1*, generándose un bucle de retroalimentación positiva (Figura 2) (Li & Dubcovsky, 2008).

Sin embargo, no son los únicos genes que intervienen en la ruta de vernalización (Figura 2). Los genes de la familia *FRUITFULL-LIKE (FUL2, FUL3)*, aunque menos estudiados que los genes *VRN*, han sido descritos para presentar una función redundante con *VRN-1*, además de ser esenciales para la arquitectura floral (Li et al., 2019a; Preston & Kellogg, 2007).

Respecto a la vía de regulación de la floración por fotoperiodo, el gen más relevante hasta la actualidad es *PHOTOPERIOD1 (PPD1)*. Los genes *PPD1* son ortólogos de los genes reguladores de pseudo-respuesta (*PRR*) (Beales et al., 2007). En concreto, *PPD1* de trigo es un homólogo del gen *PPD-H1* de cebada, el cual es miembro de la familia de *PRR* (Beales et al., 2007; A. Turner et al., 2005). Las proteínas *PRR* se localizan comúnmente en las plantas, y están involucradas en las vías asociadas al ciclo circadiano (Nakamichi et al., 2005). Además de *PPD1*, en esta vía reguladora intervienen también los genes parálogos *CONSTANS (CO1 y CO2)*. El gen *PPD1*, en condiciones de día largo, juega un papel esencial en la activación de *VRN-3* (Figura 2) (Shaw et al., 2012), mientras que los genes *CO* tienen una función secundaria pero funcional. Esto implica que, en ausencia de *PPD1*, los genes *CO* son también capaces de activar la floración en condiciones de día largo (Figura 2) (Shaw et al., 2020). Los genes *CO* actúan además como inhibidores de *VRN-2* mediante competencia por interactuar con los complejos nucleares, favoreciendo así la liberación de *VRN-3* (Figura 2) (Kippes et al., 2016; Li et al., 2011).

Referente a la vía de la precocidad per se, a pesar de ser independiente a estímulos ambientales, interacciona con la vía de vernalización (Debernardi et al., 2022a). *APETALA2-LIKE (AP2L)* es un gen represor de la floración (a través de la inhibición de *VRN-3*) que debe ser reprimido por

miR172 mediante silenciamiento génico post-transcripcional para que se detenga el bloqueo a *VRN-3* (Debernardi et al., 2022a). Por otra parte, una vez ha pasado la vernalización, *VRN-1* inhibe parcialmente a *AP2L*, fomentando indirectamente la floración (Figura 2) (Debernardi et al., 2022b).

El ciclo circadiano juega un papel importante en la coordinación de las tres rutas mediante el control del gen *GIGANTEA (GI)*, cuya expresión depende del reloj circadiano. En condiciones de día largo, *GI* degrada al represor transcripcional de *CO*, permitiendo la expresión de este y la consiguiente activación de *VRN-3* (Li et al., 2024). Por otro lado, también interactúa con miRNA172, incrementando su actividad represora sobre *AP2L* y, en última instancia, acelerando la floración (Figura 2) (Li et al., 2024).

Los trigos de primavera, que son capaces de florecer sin necesidad de bajas temperaturas, han evolucionado a partir de las variedades ancestrales de invierno (con requerimientos de vernalización) como resultado de distintas mutaciones en los genes *VRN* (Gomez et al., 2014). Igualmente, los trigos ancestrales silvestres eran plantas de día largo sensibles a fotoperiodo, y la insensibilidad a fotoperiodo observada en numerosas variedades de trigo cultivadas es el resultado de mutaciones en los genes *PPDI* (Thomas, 1997).

Conocer el funcionamiento de la red genética y el efecto de los distintos alelos que regulan la adaptabilidad del trigo a las distintas condiciones ambientales es fundamental para determinar posibles dianas de proyectos de mejora genética vegetal cuyo objetivo sea maximizar el rendimiento bajo las cambiantes condiciones climáticas. Con este objetivo, además de un profundo conocimiento sobre la regulación genética detrás de la respuesta de las plantas, es importante disponer de poblaciones con una elevada diversidad genética. Con ello, será posible estudiar el efecto causado por la variabilidad alélica y aumentará el potencial de selección.

1.5. Variedades locales y mejora genética vegetal.

Las variedades comerciales de trigo que se utilizan en la actualidad son fruto de adaptaciones sucesivas en base a las necesidades de cada época. El importante incremento de la producción agrícola que se llevó a cabo para erradicar el hambre y la desnutrición en los países subdesarrollados en la segunda mitad del siglo XX se denominó la “revolución verde”. Dicha revolución se basó principalmente en los genes del enanismo (Davière & Achard, 2013), en la resistencia a estreses bióticos, insensibilidad a fotoperiodo y el potencial de alto rendimiento. Las variedades semi-enanas de trigo, resistentes al encamado y de alta productividad, desarrolladas en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) mediante métodos de mejora convencionales, reemplazaron a las variedades locales sembradas tradicionalmente por

los agricultores (Smale et al., 2002). El germoplasma de trigo del CIMMYT ha impactado desde entonces en casi todos los programas de mejora de trigo a nivel mundial, lo que ha contribuido a la selección y fijación de alelos favorables, pero ha llevado también a la pérdida de diversidad genética del cultivo (Niu et al., 2023). Dicha pérdida de variabilidad genética limita la capacidad de dar respuesta a nuevas necesidades e incrementa la vulnerabilidad de los cultivos frente al cambio climático o la aparición de nuevas plagas o enfermedades.

Para ello, la mejora genética vegetal necesita disponer de recursos fitogenéticos. La variabilidad existente en especies silvestres relacionadas (introgresión) y la diversidad genética disponible en las colecciones de variedades locales de trigo y parientes silvestres (Skovmand et al., 2001) están consideradas el reservorio de la diversidad perdida como consecuencia de la mejora y del cambio en las técnicas agrícolas en la “revolución verde”. Las variedades locales y variedades silvestres que no fueron domesticadas han evolucionado durante miles de años, adaptándose constantemente a diferentes condiciones ambientales. En consecuencia, son una fuente de variabilidad genética no explorada y rasgos adaptativos con potencial aplicación en la mejora de las actuales variedades comerciales (Lopes et al., 2015). Concretamente en España, donde existe una gran diversidad climática en las distintas regiones de la Península Ibérica, las variedades locales se han adaptado condiciones de temperatura y disponibilidad de luz muy variadas.

1.6. Objetivos.

El principal objetivo de este estudio es profundizar en el conocimiento de las vías moleculares que regulan el proceso de floración en trigo. Para ello, se han fijado los siguientes objetivos específicos:

- Identificar la variabilidad alélica existente en las 16 variedades locales españolas de genes implicados en la regulación del proceso de floración mediante marcadores moleculares previamente descritos en la bibliografía.
- Identificar nuevos alelos de genes implicados en la regulación del proceso de floración mediante estudios de secuenciación.
- Comprender las interacciones génicas que se dan en las vías moleculares que regulan el proceso de floración mediante estudios de expresión de genes de floración en 16 variedades locales españolas.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal.

Para este estudio se han empleado 16 variedades locales seleccionadas por el grupo de Mejora Genética de Plantas de la Universidad Politécnica de Madrid. Este conjunto fue el seleccionado a partir de una colección de 189 variedades locales españolas provistas por el CRF-INIA (Centro de Recursos Fitogenéticos, CSIC-INIA, Madrid), porque representan la colección completa de variedades españolas por su diversidad genética y geográfica (López-Fernández et al., 2024; Pascual et al., 2020). Las variedades fueron sembradas en el campo de experimentación agronómica de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) de la Universidad Politécnica de Madrid. De cada variedad local se sembraron 42 surcos (1 metro de longitud, espaciados 20 cm) que fueron divididos en 3 grupos (réplicas biológicas) (Figura 3). El mismo proceso se realizó con la variedad local “Chinese Spring”. Esta última fue utilizada como variedad control.

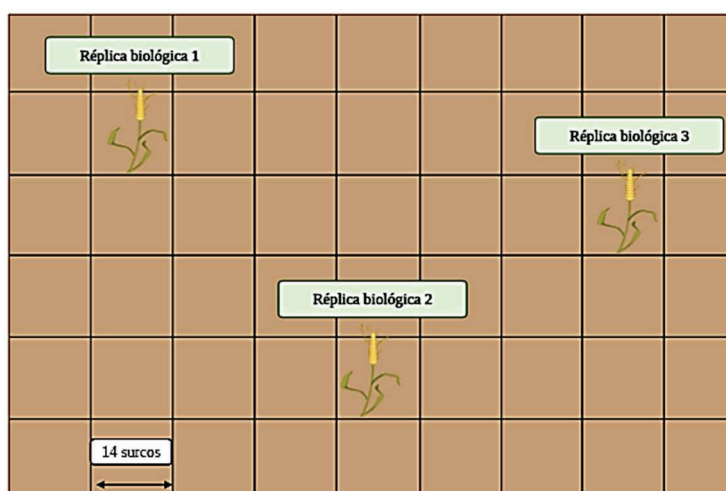


Figura 3: Esquema de la parcela de siembra y la obtención de réplicas biológicas. La parcela fue subdividida en 54 segmentos (correspondientes a las 17 variedades con 3 réplicas biológicas cada una). Cada variedad se sembró en 42 surcos distribuidos en 3 bloques de 14 surcos. Las réplicas biológicas fueron distribuidas de forma dispersa en la superficie de siembra para minimizar el efecto de la variabilidad del terreno.

2.2. Fenotipado

En las tres réplicas biológicas de las 16 variedades locales cultivadas se analizaron los días a espigado como el número de días transcurridos entre el día de siembra y el día de espigado (día en el que la mitad de las espigas de la parcela emergen visiblemente de la vaina) (Figura 4). Según los días a espigado, las 16 variedades se dividieron en tres grupos: floración temprana (hasta 155 días), la floración intermedia (entre 155 y 170 días) y floración tardía (más de 170 días). Este

registro se llevó a cabo en los ensayos de las temporadas 2017-2018, 2018-2019, 2020-2021 y 2023-2024.



Figura 4 Día de espigado: cuando la primera flor sale de la base de la hoja bandera.

2.3. Análisis de expresión

2.3.1. Recolección del material vegetal.

De las 16 variedades y del control cultivados en el campo se recogieron 6 hojas bandera el día de antesis (día en el que las espigas tienen la primera antera asomando en su parte central) por cada réplica biológica (Figura 5). Las muestras se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido y fueron conservadas a -80 °C hasta su maceración y posterior extracción de ARN. La maceración se llevó a cabo en nitrógeno líquido en morteros de porcelana previamente esterilizados. Las seis hojas de cada réplica biológica fueron maceradas juntas, y de cada réplica biológica se recogió material vegetal macerado en dos tubos eppendorf libres de ARNasas (dos réplicas técnicas) para la extracción de ARN.



Figura 5 Día de antesis: espiga en estado de antesis. Rodeado se puede ver la primera antera abierta de la flor.

2.3.2. Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de las muestras con TRIzol™ (Invitrogen™) siguiendo el protocolo de la casa comercial. Se añadió 1 mL de TRIzol a la muestra previamente macerada y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante cinco minutos. Sobre el TRIzol se añadió cloroformo 1:5 (v,v) respecto al volumen inicial de TRIzol. Se mezcló mediante inversión, se incubó tres minutos a TA y se centrifugó durante 15 minutos, a 13000 rpm y a 4 °C. Posteriormente se transfirió el sobrenadante y se añadió isopropanol frío 1:2 (v,v) respecto al volumen inicial de TRIzol. Se incubaron las muestras 10 minutos en hielo y se centrifugaron durante 10 minutos a las revoluciones y temperatura mencionadas anteriormente. Se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol al 70%, se centrifugó cinco minutos a 7500 rpm a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. Finalmente, el sedimento fue resuspendido en 30 µl de agua libre de ARNasas y se incubó a 65 °C durante 15 minutos. Una vez resuspendido, el ARN fue cuantificado usando un Nanodrop (L Vis Plate de BMG LABTECH).

2.3.3. Tratamiento con ADNasas

El ARN extraído fue tratado con Turbo DNA-free™ kit (Thermo Fisher) para eliminar el posible ADN genómico presente en las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total libre de ADN genómico fue almacenado a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

2.3.4. Síntesis de ADNc

Se empleó el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis Flexible Pack (Nzytech™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la síntesis de ADNc se utilizó Oligo(dT)12-18 5 µM, mezcla de hexámeros aleatorios (5 ng/µL) más nueve µL de ARN de cada muestra. Se incubaron a 65 °C durante cinco minutos y posteriormente se mantuvieron en hielo. A continuación, se añadieron cuatro µL de tampón de reacción (5X), se añadieron también 2 µL del mix de dNTP, 1 µL de transcriptasa reversa (20 U/µL) y 1 µL del inhibidor de ARNasa (20 U/µL). El volumen final de reacción fueron 20 µL. Finalmente, las muestras fueron incubadas 60 minutos a 37 °C, 5 min a 25 °C, 60 minutos a 37 °C y 5 minutos a 70 °C.

2.3.5. Búsqueda de cebadores para PCR cuantitativa

Para estudiar los niveles de expresión de genes implicados en floración (*GI*, *CO1*, *CO2*, *PPD1*, *AP2L*, *FUL2*, *FUL3*, *VRN1*, *VRN2*, y *VRN3*) se utilizaron cebadores descritos en la bibliografía (Tabla 1).

Tabla 1 Cebadores para el análisis de expresión de los genes de estudio.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Longitud (nt)
<i>Actina</i>	qActina_F	ACC TTC AGT TGC CCA GCA AT	20
	qActina_R	CAG AGT CGA GCA CAA TAC CAG TTG	24
<i>VRN1</i>	qVRN1_F	AAG AAG GAG AGG TCA CTG CAG G	22
	qVRN1_R	GGC TGC ACT GCC GCA	15
<i>VRN2</i>	qVRN2_F	CCA CCA TCG TGC CAT TCT	18
	qVRN2_R	CCC ACC ATC ATC TCT GTA TCA A	22
<i>VRN3</i>	qVRN3_F	CAG CAG CCC AGG GTT GAG	18
	qVRN3_R	ATC TGG GTC TAC CAT CAC GAG TG	23
<i>CO1</i>	qCO1_F	CAC ATC AGA GTG GTT ATG C	19
	qCO1_R	GGA CTG GAC CGT ATT GTC	18
<i>CO2</i>	qCO2_F	AAG GGT GTG AGT GTG TAG	18
	qCO2_R	GAT ATG TCA TTG CTG ATG GAA G	22
<i>FUL2</i>	qFUL2_F	CCA TAC AAA AAT GTC ACA AGC	21
	qFUL2_R	TTC TGC CTC TCC ACC AGT TC	20
<i>FUL3</i>	qFUL3_F	ATG GAT GTG ATT CTT GAA CG	20
	qFUL3_R	AGT TGC CTT TGA CTC TTC TG	20
<i>GI</i>	qGI_F	ACT GCA CCT TTG GGC ATT AG	20
	qGI_R	GGC TGT AAG CAG TTG TTG GAG	21
<i>AP2L</i>	qAP2L1_F	ACA ACC CAT GCC ACT CTT CT	20
	qAP2L1_R	GTG TTG GTT GCT TGA CGA TG	20
<i>PPD1</i>	qPPD1_F	CGG CAT TCA CGA GGT ACA ATA C	22
	qPPD1_R	GAG CCT TGC TTC ATC TGA GCG	21

2.3.6. PCR cuantitativa (qPCR)

Para realizar las PCRs cuantitativas se hicieron dos réplicas técnicas de cada una de las 3 réplicas biológicas de cada variedad. Para cada reacción se mezclaron 10 μ L de 2xFastStart Essential DNA Green Master, Roche® con colorante SYBR Green, 1 μ L de cada cebador [10 μ M] (directo y reverso), 2 μ L de cDNA y 6 μ L de agua. Para realizar las qPCR se utilizó el equipo Roche® Light Cycler 96.

Se analizó la expresión de los 10 genes de floración descritos en el apartado anterior usando como gen de referencia la actina. Los valores de Ct (ciclo umbral, es decir, el número de ciclos necesarios para que la muestra alcance el punto crítico de ser detectada y/o cuantificada) fueron

utilizados para calcular la expresión relativa mediante el método comparativo $\Delta\Delta Ct$ (Livak & Schmittgen, 2001). Los niveles de expresión del gen de referencia actina se emplearon para relativizar los niveles de expresión de los genes de floración.

2.3.7. Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software R v.4.1.3 (R Core Team 2020). Las medias y desviaciones estándar de los caracteres fenotípicos analizados se calcularon tanto para las variedades locales como las variedades control.

La prueba de normalidad “Shapiro-Wilk” ($P < 0.01$) se empleó para evaluar la normalidad de los resultados de la expresión relativa y la homogeneidad de varianza se evaluó con la prueba “Levene” ($P < 0.05$). Cuando las varianzas no eran homogéneas y los datos no se ajustaban a una normalidad, se empleó el estudio no paramétrico de “Kruskal-Wallis” ($P < 0.05$) para conocer si existían diferencias significativas entre los niveles de expresión de los genes de floración entre las 16 variedades locales. Posteriormente una prueba “Post hoc” mediante el “dunnTest” con ajuste de “Bonferroni”, fue realizado para separar a los grupos por nivel de significancia. También fue analizada mediante el método “Spearman” la correlación entre los datos de expresión de cada gen con respecto a los fenotipos de tiempo de floración (temprana, intermedia y tardía).

2.4. Estudio de secuenciación del gen *VRN2*

2.4.1. Extracción de ADN.

Una hoja de cada variedad local fue macerada en nitrógeno líquido para la extracción de ADN genómico. Cada muestra fue incubada con agitación en 500 μL de tampón de extracción (2% p/v CTAB, 1'4 M NaCl, 20 nM EDTA, 100 mM TRIS-HCl) durante 20 minutos a 65°C. Para eliminar proteínas y lípidos se añadió el mismo volumen de cloroformo-isopentanol (24:1) que de tampón de extracción, y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. Para precipitar el ADN se añadieron 400 μL de isopropanol al sobrenadante. Se precipitó el ADN mediante centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos y se lavó el precipitado con 500 μL de tampón de lavado (etanol 76% v/v, acetato de amonio 10 mM). Se resuspendió en 50 μL de tampón TE. Finalmente, se realizó un tratamiento con RNasa (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se conservó a -20°C.

2.4.2. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se usó el genoma de referencia de “Chinese Spring” disponible en la base de datos EnsemblPlants. Las secuencias de los tres genes homeólogos *VRN2-A*, *-B* y *-D* se tomaron de la base de EnsemblePlant. Se alinearon las secuencias de los tres homeólogos con el método MUSCLE y se diseñaron los cebadores en regiones específicas de cada gen homeólogo. Se diseñaron parejas de cebadores (Tabla 2) para amplificar fragmentos solapantes de entre 1000

y 1800 pares de bases que cubrieron la longitud total de los tres genes homeólogos de *VRN2* (Figura 6).

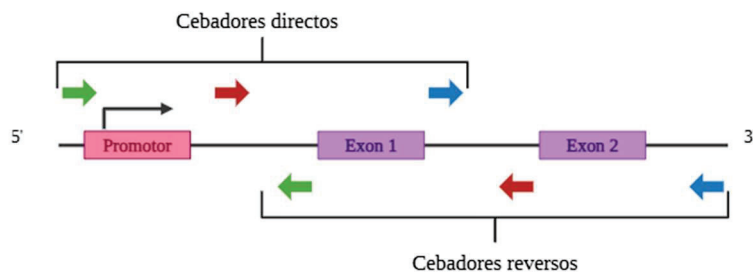


Figura 6 Representación gráfica de la posición de los cebadores solapantes diseñados para secuenciar el gen *VRN2*.

2.4.3. Secuenciación del gen *VRN2*

Cada reacción se hizo en un volumen final de 25 μ L: 2 μ L de ADN genómico (diluido 20 veces), 12'5 μ L de DNA AmpliTools Complex Master Mix 2x (BioTools), 1'25 μ L de cada cebador (directo y reverso) y se completó con agua hasta alcanzar los 25 μ L. En el caso de la pareja F24D/R24D se añadió 0'5 μ L de $MgCl_2$ para incrementar la afinidad de los cebadores.

Las condiciones de la PCR fueron: Desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 40 segundos a distintas temperaturas según la pareja de cebadores y 1'5 minutos a 72°C. Dichas temperaturas fueron 53°C (F24D/R24D), 60°C (F15A/R15A, F25A/R25A, F14B/R14B, F24B/R24B) y 65°C (F14D/R14D, F34D/R34D). Por último, una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando columnas de Sephadex G-50 Superfíne según las instrucciones del fabricante. El Sephadex fue polimerizado y los productos de PCR fueron cargados en las columnas resultantes. Tras una centrifugación 2 minutos a 2000 rpm, se recolectaron los productos de PCR.

Cada producto de PCR purificado (5 μ L) junto con el cebador correspondiente (5 μ L a 10 μ M) (Tabla 2) fueron enviados a Macrogen España para su secuenciación. El método de secuenciación empleado fue Sanger.

Las secuencias fueron analizadas usando el software Geneious Prime, donde los fragmentos fueron alineados mediante el método MUSCLE. Se descartaron aquellas bases con baja resolución y los alineamientos fueron validados manualmente.

Tabla 2 Cebadores para secuenciar el gen VRN2 y el tamaño del fragmento amplificado (bp).

Gene ^a	Fragmento	Cebador	Secuencia 5'-3'	bp
TraesCS5A02G541300 VRN2 (5A)	Exón 1	F15A	TTGAGCAATATTTTGATAGTTG	1,840
		R15A	AAGGCGTAACTTCATCAAT	
	Exón 2	F25A	AACATATCTCTTTATGGGATC	1,572
		R25A	GCAATCGTGATGGTGTACTT	
	Promotor	F35A	GCAGGACGAGAAGATCAGAA	1168
		R35A	GTGTGGTCCATGTTCTGCTA	
TraesCS4B02G372700 VRN2 (4B)	Exón 1	F14B	GACATCTCTCCTCCTCGGATC	1017
		R14B	GGACACCTGTACGACCAGAC	
	Exón 2	F24B	CTCATACGATTAGAGACAGC	1362
		R24B	TAATGGCTCCAATCGGTTCG	
	Promotor	F34B	TTCAATGTCCACCACCATCA	1754
		R34B	GTAGGGGTGTAGATGGACAT	
TraesCS4D02G364500 VRN2 (4D)	Exón 1	F14D	GACATCTCTCCTACTCGGCTC	820
		R14D	GTATGACTGATGATTTGAGTGA	
	Exón 2	F24D	TTCGGAATTACTTGTACCGG	1840
		R24D	ATAACAACTTTATACATAAGAAG	
	Promotor	F34D	TTGCCCTAGAGCTCGAGACT	1505
		R34D	AACTGGTGCTCGCGTAGC	

^a Código del gen respecto a la página de búsqueda “EnsemblePlants” con respecto a la variedad local “Chinese Spring”. Traes = Triticum aestivum; CS= Chinese Spring.

2.5. Genotipado del gen homeólogo VRN1-D mediante marcadores moleculares basados en PCR.

Para genotipar el gen *VRN1D* se utilizaron marcadores moleculares previamente descritos en la bibliografía (Tabla 3)

Tabla 3 Marcadores moleculares utilizados para la detección de alelos del gen VRN-1D.

Alelo	Cebadores	Secuencia 5'-3'	TA (°C)	bp	Fuente
<i>Vrn-D1r</i>	D1r_F	CTCAAATAGTTTGTGTCTGATTTTG	57.5	262	(Makhoul et al., 2022)
	D1r-R	GTTCAGTAGGAGGTGACATTCG			
<i>Vrn-D1x</i>	D1x_F	CGTCGTATGATGATGCAACAATG	62	244	(Makhoul et al., 2022)
	D1x-R	CATTAATGGTCAGGTGTCGGTCA			
<i>VRN-D1s</i> (i)	D1sa_F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC	61	1841 (i)	(Fu et al., 2005)
<i>VRN-D1a</i> (d)	D1sa_R	GGTCACTGGTGGTCTGTGC		1671 (d)	
<i>vrnD1</i>	D1_F	GTTGTCTGCCTCATCAAATCC	61	997	(Fu et al., 2005)
	D1_R	AAATGAAAAGGAACGAGAGCG			

(i) inserción, (d) delección

Para el análisis mediante marcadores moleculares se utilizó ADN genómico de cada variedad extraído según se ha descrito en el apartado anterior. Las condiciones y el programa de PCR utilizado fueron iguales que las descritas en el apartado anterior, pero con un TM de 64°C.

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% TAE1X teñido con GreenSafe y visualizado bajo luz UV.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Variabilidad en el tiempo de floración en variedades locales españolas

La Tabla 4 muestra el número de días entre el día de siembra y el día de espigado en los ensayos realizados en las distintas temporadas. En base a la media calculada con los datos de las tres réplicas biológicas de cada variedad, las variedades locales fueron agrupadas en tres grupos: variedades de floración temprana, intermedia y tardía.

Tabla 4 Registro de días entre la cosecha y el día de espigado (DE). Los datos recogidos corresponden a las temporadas de siembra entre 2017/2018 y 2023/2024, a excepción de 2019/2020. Variedades tempranas, intermedias y tardías.

Variedad	DE 17-18	DE 18-19	DE 20-21	DE 23-24	Medias DE	Grupo fenotípico
310	178	142	163	159	161±15	Intermedia
324	189	157	185	172	176±14	Tardía
330	174	141	161	155	158±14	Intermedia
343	184	149	173	171	169±15	Intermedia
355	188	150	178	165	170±16	Tardía
401	184	147	171	159	165±16	Intermedia
412	172	135	152	146	151±16	temprana
416	178	139	154	150	155±16	temprana
434	184	149	177	169	170±15	Tardía
441	187	155	174	169	171±13	Tardía
472	184	142	174	169	167±18	Intermedia
486	195	152	184	173	176±18	Tardía
501	175	131	142	145	148±19	temprana
502	184	141	161	155	160±18	Intermedia
508	188	150	167	160	166±16	Intermedia
CS	169	139	163	145	154±14	temprana

3.2. Variabilidad genética de las variedades locales españolas

La Tabla 5 muestra los alelos del gen *VRNI-D*, analizado en este trabajo, presentes en cada variedad. Asimismo, en la Tabla 5 se muestran los alelos de los genes *VRNIA*, *VRNIB*, *PPD-B1* y *PPD-D1* analizados previamente por Giménez et al. (2025, en revisión).

Los alelos marcados en azul se han identificado como alelos vinculados a una floración temprana (Fu et al., 2005; Makhoul et al., 2022). Se puede comprobar que las variedades tardías e intermedias son portadoras de ningún o, como mucho, un alelo de floración temprana, mientras que las variedades de floración temprana portan 2 o 3 alelos de floración temprana (Tabla 5).

Tabla 5 Alelos del gen VRN1 y PPD1 en cada homeólogo presentes en las distintas variedades. En azul se muestran aquellos alelos asociados a una floración temprana. Abreviaturas: na (sin datos disponibles), CS (Chinese Spring).

Variedad	VRN-A1	VRN-B1	VRN-D1	PPD-B1	PPD-D1	Grupo fenotípico
310	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Intermedia
324	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>ppd-D1</i>	Tardía
330	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Intermedia
343	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Intermedia
355	<i>na</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Tardía
401	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Intermedia
412	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>Ppd-B1a</i>	<i>Ppd-D1a</i>	Temprana
416	<i>Vrn-A1a</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>Vrn-D1a</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Temprana
434	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>ppd-D1</i>	Tardía
441	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>ppd-D1</i>	Tardía
472	<i>Vrn-A1b</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Intermedia
486	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Tardía
501	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>Vrn-D1a</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1a</i>	Temprana
502	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>na</i>	Intermedia
508	<i>vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1a</i>	<i>vrn-D1</i>	<i>ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	Intermedia
CS	<i>vrn-A1</i>	<i>vrn-B1</i>	<i>Vrn-D1a</i>	<i>Ppd-B1a</i>	<i>ppd-D1</i>	Temprana

En el caso de los genes de vernalización, en estas 16 variedades predominan los alelos asociados a la necesidad de vernalización (*vrn-A1*, *vrn-B1*, *vrn-D1*). Respecto a la sensibilidad a fotoperiodo, el alelo mayoritario en estas variedades locales son los alelos sensibles a fotoperiodo (*ppd-B1* y *ppd-D1*). En las 16 variedades locales españolas analizadas predominan los alelos que condicionan una floración tardía.

3.3. Secuenciación *VRN-2*.

La secuenciación permitió detectar la presencia de polimorfismos en el gen *VRN-2* de las distintas variedades.

Se han encontrado 4 polimorfismos de un único nucleótido (SNP, del inglés *Single Polymorphism Nucleotide*) en el exón 1 del gen *VRN-2A*. Dichas mutaciones están ligadas (Figura 7) y presentes en las variedades 355, 416, 501 y 508. El polimorfismo C:T implica un cambio en el aminoácido codificado (Leucina en lugar de Prolina). El polimorfismo C:G implica también un cambio de aminoácido (Ácido glutámico en lugar de Glutamina). Finalmente, los polimorfismos T:C y A:G son silenciosos y no provocan cambio de aminoácido en la proteína codificada. También se han encontrado SNPs en la región promotora e intrónica de *VRN-2A* (no mostrado).

Respecto al gen *VRN-2B*, se han detectado polimorfismos tipo InDel (deleciones/inserciones) en ambos exones al analizar los productos de PCR en geles de agarosa (Figura 8). En el primer exón las variedades 324, 330, 343, 416, 401, 441 y 502 presentan un amplicón de menor tamaño que el de la variedad control Chinese spring y que el resto de las variedades locales españolas (Figura 8A). El segundo exón también muestra variabilidad alélica, ya que el análisis de los productos de PCR en geles de agarosa detecta un polimorfismo tipo InDel por presencia/ausencia de producto de PCR en las distintas variedades (Figura 8B).

Respecto al gen homeólogo *VRN-2D*, se ha detectado un polimorfismo tipo SNP (C:T) en la región promotora de la variedad local 324 (no mostrado).



Figura 7 Alineación mediante el método ClustalW de secuencias correspondientes al exón 1 de *VRN-2A*. En rosa están señaladas las mutaciones asociadas a un cambio de aminoácido codificado. En azul, las mutaciones silenciosas. La imagen ha sido tomada del software de alineación de secuencias Geneious Prime. CS = Chinese Spring.

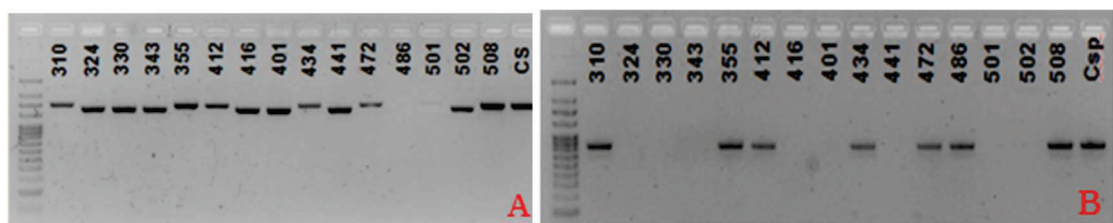


Figura 8 A: Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR correspondiente al exón 2 de VRN2. B: Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR correspondiente al exón 2 de VRN2.

3.4. Correlación entre la expresión génica.

Los análisis de correlación entre los niveles de expresión de los distintos genes y el tiempo de floración (medido en días a espigado) muestran que los niveles de expresión de los genes *VRN2*, *VRN3*, *AP2L*, *FUL2*, *FUL3*, *GI* y *PPD1* podrían estar relacionados con el tiempo que necesitan las variedades para iniciar la floración ($p < 0.05$) (Tabla 6).

El coeficiente de correlación de “Spearman” (r_s) indica la fuerza y dirección de la relación lineal entre los niveles de expresión y el tiempo de floración. Los genes *VRN-2* y *VRN-3* muestran una correlación negativa moderada, lo que implica que cuando su expresión aumenta, el tiempo requerido para florecer disminuye. *AP2L*, *FUL3*, *GI* y *PPD1* también muestran correlación negativa, pero más débil que *VRN-2* y *VRN-3*. Sin embargo, *FUL2* presenta una correlación positiva media, lo cual indica que su expresión podría relacionarse con un retraso en el inicio de la floración.

Por último, la expresión de los genes *VRN-1*, *CO1* y *CO2* no muestra correlaciones significativas con el tiempo de floración.

Tabla 6 Estudio de Correlación de Spearman entre el nivel de expresión y la manifestación fenotípica.

Gen	P-valor	r_s	Significancia
<i>VRN1</i>	0,826	-0,02	NO
<i>VRN2</i>	5,08E-07	-0,52	SI
<i>VRN3</i>	2,00E-06	-0,49	SI
<i>AP2L</i>	1,74E-02	-0,25	SI
<i>CO1</i>	0,4638	-0,08	NO
<i>CO2</i>	0,3411	0,1	NO
<i>FUL2</i>	4,74E-05	0,42	SI
<i>FUL3</i>	1,17E-02	-0,27	SI
<i>GI</i>	5,23E-04	-0,37	SI
<i>PPD1</i>	0,049	-0,21	SI

Se estudiaron las diferencias de expresión entre los grupos fenotípicos mediante el análisis estadístico “Kruskal-Wallis” (Figura 8). Los resultados obtenidos respecto a *VRN-1*, *CO1* y *CO2*, como se preveía con los estudios de correlación de “Spearman”, confirmaron que no existen diferencias significativas en su expresión entre las variedades tempranas, intermedias y tardías.

Como se puede observar, existen diferencias significativas en los niveles de expresión de *AP2L* entre las variedades de floración temprana y las de floración tardía, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos y las variedades de floración intermedia (Figura 9A). Las variedades tempranas mostraron niveles de expresión más altos, mientras las variedades tardías mostraron niveles de expresión más bajos y con mayor dispersión.

De manera similar, los niveles de expresión de *FUL3* y *GI* (Figura 9C y 9D) solo mostraron diferencias significativas entre variedades tempranas y tardías, con menor expresión en las variedades tardías y mayor en las tempranas.

Los niveles de expresión de *VRN-2* y *VRN-3* siguieron un patrón similar a los ya descritos, donde las variedades tempranas presentan mayores niveles de expresión que las variedades tardías. En ambos casos las diferencias destacaron por ser más significativas, destacando que también se observaron diferencias significativas entre variedades intermedias y tardías (Figuras 9F y 9G). El gen *PPDI*, a pesar de que la prueba de correlación indica que su expresión está relacionada con el fenotipo, no muestra diferencias significativas entre los distintos grupos, aunque se puede observar que existe una tendencia similar a la descrita en los genes anteriores (Figura 9E).

Por el contrario, y coincidiendo con los resultados del estudio de correlación (tabla 6), el gen *FUL2* fue el único cuyo patrón cambió, mostrando diferencias significativas en los niveles de expresión: mayor expresión en la variedades tardías y menor expresión en las tempranas (Figura 9B).

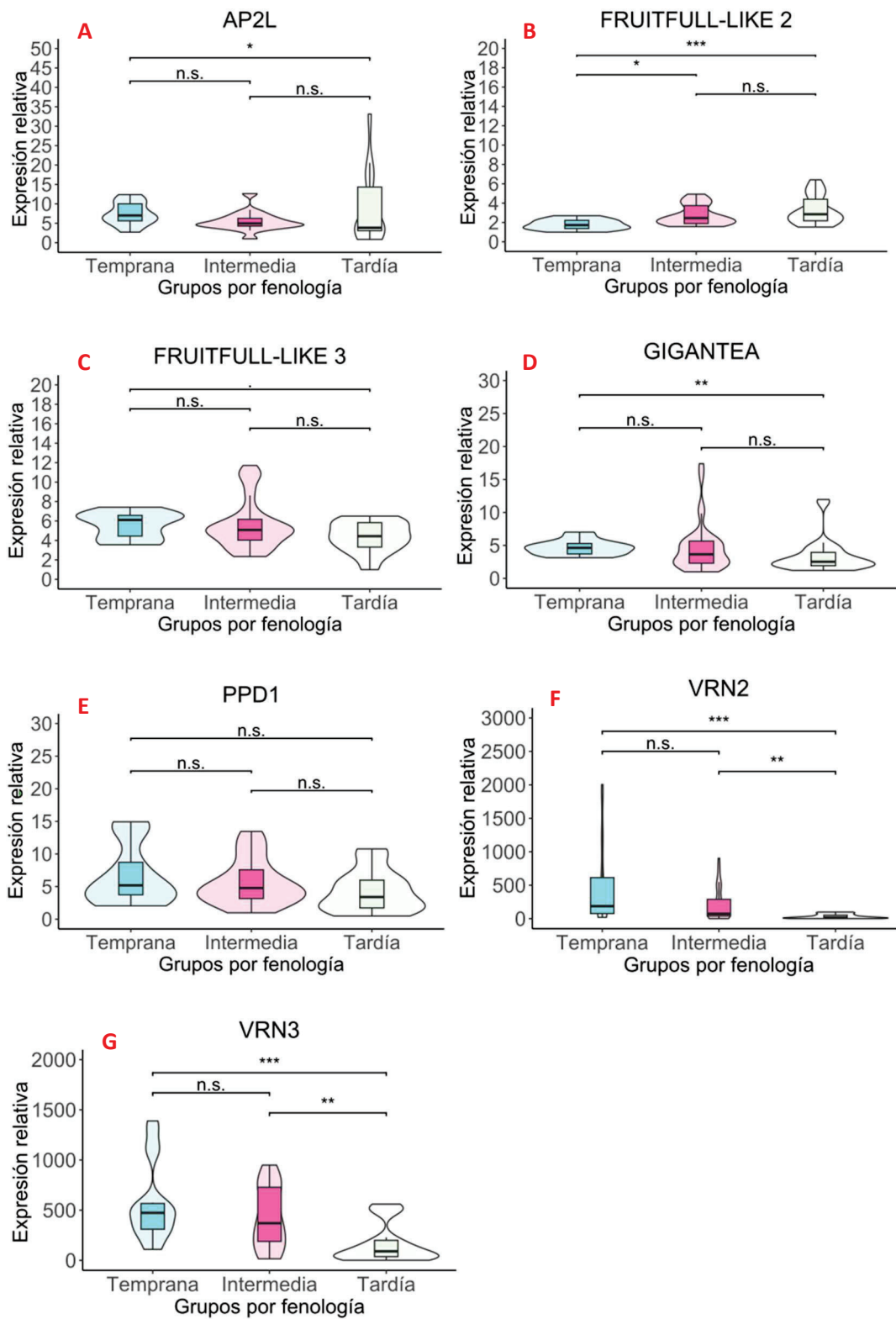


Figura 9 Expresión relativa de los genes de floración en variedades locales españolas. Las cajas representan el rango intercuartílico y la línea la mediana. La significancia de las diferencias fue estudiada mediante Kruskal-Wallis. No significativo, $p > 0.05$ (n.s.). Significativo, $p < 0.1$ (-), $p < 0.05$ (*). Muy significativo, $p < 0.01$ (**). Altamente significativo, $p < 0.001$ (***).

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos revelan que las variedades locales seleccionadas para el estudio presentan gran variabilidad tanto genotípica como fenotípica. La variabilidad alélica y las diferencias en los niveles de expresión de genes de floración parecen influenciar el tiempo requerido para que se inicie la floración en las variedades locales españolas estudiadas.

4.1. Efecto de la variabilidad alélica en la regulación de la floración

Las variedades locales españolas analizadas presentan variabilidad alélica en los genes *VRN-1* y *PPDI*, los genes con mayor efecto en la regulación de sus respectivas rutas (Chen & Dubcovsky, 2012; Langer et al., 2014). Los alelos primaverales de *VRN-1* (*Vrn-1Aa*, *Vrn-1Ab*, *Vrn-1Ba*, *Vrn-1Da*) y los alelos insensibles al fotoperiodo (*Ppd-B1a*, *Ppd-D1a*) han sido previamente descritos para promover la floración temprana (A. Pugsley, 1966; Yan, Helguera, et al., 2004) y se encuentran representados en este estudio.

La distribución de alelos insensibles a fotoperiodo de *PPDI* es más definida, ya que solo se encuentran en variedades tempranas. Sin embargo, los alelos tempranos de *VRN-1* están representados en variedades de floración temprana, intermedia y tardía. Los alelos de floración temprana presentes en las variedades intermedias y tardías (*Vrn-1Bb* y *Vrn-1Cb*) han sido descrito como alelos con menos influencia en el tiempo de floración que los alelos *Vrn-1Aa* y *Vrn-1Da* (Goncharov et al., 2004; Giménez et al., 2025, en revisión), lo que puede justificar su presencia en este grupo de variedades. En coherencia, el alelo *Vrn-1Aa* y *Vrn-1Da* está presente exclusivamente en variedades tempranas, mientras que *Vrn-1Bb* y *Vrn-1Cb* se encuentra en variedades tempranas, intermedias e incluso tardías.

La variedad 472 porta el alelo dominante *Vrn-1Ab* que, al ser epistático sobre *vrn-1B* y *vrn-1D* (A. Pugsley, 1971; A. T. Pugsley, 1972), debería ser suficiente para reducir los días necesarios para florecer. Sin embargo, no es una variedad temprana, sino intermedia. Por otra parte, la variedad 416 presenta todos los alelos relacionados con una menor necesidad de vernalización respecto al gen *VRN-1*, incluido *Vrn-1Aa*. En este caso, sí pertenece al grupo de las variedades tempranas, aún dentro del umbral de los 155 días, es la variedad que requiere mayor número de días a floración.

El motivo puede ser que, a pesar de no tener necesidad de vernalización, presentan alelos sensibles al fotoperiodo. Este hecho destaca la importancia de la interacción entre ambas rutas, ya que la sensibilidad al fotoperiodo en estas variedades puede estar contrarrestando parcialmente el efecto de los alelos tempranos de *VRN-1* (F. Chen et al., 2013; Palomino & Cabrera, 2023). Esto queda también evidenciado en algunas variedades intermedias (330, 343, 508), que presentan alelos tempranos de *VRN-1* pero siguen siendo dependientes de las condiciones ambientales, por lo que

requieren un mayor número de días para florecer. Las combinaciones de alelos tempranos de *VRN-1* y sensibles a fotoperiodo de *PPD1* pueden generar un efecto compensatorio que conlleva necesidades ambientales moderadas.

4.2. Efecto de la variabilidad alélica de *VRN2* en el tiempo de floración

VRN-2 es un factor clave en la red genética que regula la floración, por lo que variaciones en su actividad podrían conllevar alteraciones en el tiempo de floración. Sin embargo, *VRN2* es el gen de vernalización menos estudiado en trigo y por ello, en este trabajo, hemos buscado nueva variabilidad alélica mediante estudios de secuenciación en los tres genes homeólogos: *VRN2A*, *VRN2B* y *VRN2D*.

Se ha descrito que tanto deleciones como SNPs en la región codificante de los genes *VRN-2* pueden eliminar el requerimiento de frío (Nishiura et al., 2018). Esto puede ser porque se inhibe la expresión del gen o porque cambia la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada y esta deja de ser funcional. Entre las mutaciones detectadas en este trabajo, destaca la mutación en el exón 1 de *VRN-2A* que cambia una prolina por una leucina, cambio que puede tener impacto en la funcionalidad de la proteína debido a la diferencia entre sus propiedades fisicoquímicas. De hecho, ya se han descrito mutaciones que intercambian estos aminoácidos en genes expresados en grano cuyo resultado ha sido la pérdida de función de las proteínas (Lillemo & Morris, 2000).

El exón 1 codifica para un dominio de dedos de zinc (Zn), dominio clásico de unión a ADN, pero se desconoce cómo interviene en la ruta genética que regula la floración (Yan, Loukoianov, et al., 2004b). No obstante, los dominios de dedos de Zn en plantas pueden actuar estabilizando complejos proteína-proteína (como las interacciones con los complejos nucleares que permiten la competencia entre CO y VRN2) (Li et al., 2011b), por lo que mutaciones en este dominio pueden tener efectos importantes en la actividad final de *VRN-2A* (Takatsuji, 1998).

En *VRN-2A* se han descrito también polimorfismos asociados al dominio CCT, dominio de unión a factores de transcripción, que evitan las interacciones necesarias para la correcta regulación del gen *VRN-2A* y, por tanto, del proceso floración (Distelfeld, Tranquilli, et al., 2009; Yan, Loukoianov, et al., 2004b).

De acuerdo con la literatura disponible, podría esperarse que los SNPs encontrados, especialmente aquellos que implican un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína, tuvieran algún efecto sobre la función de *VRN-2A*. Sin embargo, al haberse detectado únicamente en cuatro variedades, entre las cuales se observan comportamientos fenológicos diversos (dos tempranas, una intermedia y una tardía), y considerando el bajo número de variedades analizadas, no es posible establecer una relación clara entre los polimorfismos y el tiempo de floración. Aún cuando el objetivo principal de este estudio es la búsqueda de relaciones de genes implicados en la

floración, el detectar variabilidad alélica en este gen, representa un paso importante para futuros estudios de asociación fenotipo-genotipo en poblaciones con un número mayor de individuos.

Respecto a las deleciones detectadas en el homeólogo *VRN-2B*, estas podrían estar relacionadas con un aumento en la precocidad de floración, de la misma manera que ocurre en las deleciones del gen *VRN-2* previamente analizadas por (Distelfeld, Tranquilli, et al., 2009). Sin embargo, las variedades locales españolas que la contienen no son exclusivamente variedades tempranas, sino que la presentan variedades de los tres grupos fenológicos. La secuenciación del gen *VRN-2B* está actualmente siendo procesada, lo cual contribuirá a una mayor comprensión de los resultados observados.

Por último, las mutaciones en regiones que portan secuencias reguladoras (intrones y promotores) pueden modificar la expresión de los genes que regulan, alterando el fenotipo. En el gen *VRN-2D* hemos detectado un polimorfismo tipo SNP en la zona promotora. Polimorfismos en zonas reguladoras de genes relacionados como *VRN-1* han sido anteriormente descritos. En dicho gen se han encontrado deleciones en el intrón 1 y mutaciones en el promotor que reducen la necesidad de frío de las plantas que los portan, acelerando su floración (Muterko et al., 2016; Takumi et al., 2011).

El efecto de una mutación en la región promotora sobre la función del gen correspondiente es diverso. Puede ocurrir que una mutación altere sitios de activación del gen y que este deje de expresarse o, por el contrario, se pueden alterar sitios de represión y que el gen se exprese de forma constitutiva, como se ha descrito en los alelos *PPDI* insensibles al fotoperiodo (L. Chen et al., 2018; Seki et al., 2011). Otro ejemplo es que mutaciones en la región promotora del gen *API* (asociado con *VRN1* en trigo) pueden impedir la interacción con factores represores, lo que evita su represión y permite la expresión de *API* incluso sin vernalización, promoviendo así un hábito de crecimiento primaveral (Yan et al., 2003).

Al igual que ocurre con los polimorfismos detectados en *VRN-2A*, la baja representación del polimorfismo en el promotor de *VRN-2D* (solo detectado en la variedad 324) nos impide hacernos una idea de su efecto en el fenotipo. En definitiva, los resultados obtenidos muestran que las variedades locales españolas presentan variabilidad en el gen *VRN-2*. Con los datos disponibles, no es posible determinar si dicha variabilidad afecta la funcionalidad del gen. No obstante, la secuenciación completa de *VRN-2* en un panel más amplio de genotipos podría contribuir a esclarecer este aspecto.

4.3. Efecto de los niveles de expresión de los genes de floración en el tiempo de floración

Efecto de los niveles de expresión de los genes de floración en el tiempo de floración

Como era de esperar según la literatura (Distelfeld, Li, et al., 2009), la expresión del gen *VRN-3* es mayor en plantas de floración temprana, lo cual concuerda con su papel inductor del proceso de floración (Yan et al., 2006). Las variedades tempranas, como la 412, 416, 501 y CS, portan 2 o 3 alelos tempranos *VRN-1* y/o insensibles a fotoperiodo *PPDI*, lo que puede provocar una regulación al alza de la expresión del gen *VRN-3* y, por ende, una floración más temprana. Igualmente, la elevada expresión de *VRN-3* en variedades tempranas puede deberse a los altos niveles de expresión del regulador positivo *FUL3*.

Siguiendo con los genes de la familia *FRUITFULL*, destaca que *FUL2* se encuentra más expresado en variedades tardías a pesar de ser inductor de floración. Estos genes, en trigo, son homólogos funcionales de *VRN-1*, es decir, inductores de floración (Alvarez-Buylla, 2006). La información de estos genes en trigo es limitada, pero es posible que al igual que ocurre en otros genes en plantas, este aumento de expresión de *FUL2* sea compensatorio para suplir la deficiencia de otros genes inductores (Alvarez-Buylla, 2006). También cabría la posibilidad de que, al tratarse de homólogos funcionales de *VRN-1* (Li et al., 2019b), *FUL2* se comporte también como represor de *VRN-2* y que la inhibición de *VRN-2* en variedades tardías se deba a la elevada expresión de *FUL2*.

Respecto a *VRN-2* y *AP2L*, debido al papel represor que tienen de la floración, a través de *VRN-3*, cabría esperar que se expresara menos en las variedades tempranas. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran lo contrario. El motivo de este aparente desajuste puede estar explicado a través de los alelos insensibles a fotoperiodo *Ppd-B1a* y *Ppd-D1a* presentes en las variedades tempranas (412, 501 y CS). Se ha descrito previamente que la presencia de estos alelos insensibles a fotoperiodo provoca que la planta se comporte como si estuviera siempre en condiciones de día largo, lo que conduce a una desregulación de la red genética que puede culminar con una expresión anómala de *VRN-2* (A. S. Turner et al., 2013) y de *AP2L*.

Por otra parte, los polimorfismos de *VRN-2* encontrados por secuenciación en este trabajo pueden alterar la expresión de *VRN-2* y su correspondiente regulación. Además, el hecho de que los niveles de expresión no vayan asociados a cambios fenotípicos esperados no implica que la proteína codificante no pueda tener alterada su actividad y no ser funcional, lo que no se descarta ya que, como se ha mencionado previamente, se han encontrado mutaciones de cambio de aminoácido que se han asociado en otros genes a pérdida de función (Lillemo & Morris, 2000).

Respecto al gen *PPDI*, contrasta que, a pesar de que no mostró una correlación fuerte entre sus niveles de expresión y el tiempo de floración, ni diferencias significativas entre grupos fenológicos mediante Kruskal-Wallis, su genotipo es determinante al explicar el comportamiento fenológico (Aquí tienes que meter una referencia). Esto sugiere que el efecto de *PPDI* en el tiempo transcurrido hasta floración está asociado a la presencia/ausencia de alelos insensibles al fotoperiodo, y no a nivel de expresión cuantitativa.

Es importante destacar que los estudios de expresión solo se han llevado a cabo en un tejido y en un estadio concreto lo que puede estar impidiendo discernir de manera clara el patrón de expresión temporal de estos genes y su interacción entre ellos. Además, la red genética que regula el proceso de floración es una red de alta complejidad, con genes que actúan entre sí de forma jerárquica, redundante, epistática y antagónica (aquí deberías citar alguna revisión reciente). En este contexto, los niveles de expresión observados pueden no ajustarse de forma precisa a lo esperado, puesto que esta interconectividad dificulta establecer una relación lineal entre el nivel de expresión mostrado por cada gen y su efecto en el inicio de la floración, destacando la importancia de estudiar la red en su conjunto.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Este estudio ha permitido aumentar el conocimiento disponible sobre las rutas moleculares que intervienen en la inducción de la floración a partir de 16 variedades locales españolas con diferentes fenotipos, genotipos y perfiles de expresión.

- Las 16 variedades locales españolas seleccionadas para este estudio presentan variabilidad alélica en genes determinantes en la inducción de la floración (*VRN1* y *PPD1*). Este conocimiento servirá para analizar el efecto de los dichos alelos en el tiempo de floración a través de estudios de asociación genotipo-fenotipo en poblaciones de mayor tamaño, como es la colección completa de variedades locales españolas.
- Se han identificado nuevos polimorfismos en el *VRN2*, el gen de vernalización menos caracterizado en trigo en la actualidad, en las 16 variedades locales españolas de trigo. El efecto de estos polimorfismos sobre los requerimientos de frío y el tiempo de floración podrán ser estudiados en un futuro en la colección completa de variedades locales españolas.
- Los estudios de asociación entre los niveles de expresión de los genes de floración y el fenotipo de las variedades realizados en este trabajo nos han permitido determinar que elevados niveles de expresión de *VRN3*, el gen clave en la inducción de la floración en trigo, están asociados a una floración temprana.
- La expresión del resto de los genes de la vía de vernalización también muestra una asociación con el tiempo de floración. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender la asociación entre los niveles de expresión de dichos genes y el fenotipo.
- No existe asociación entre los niveles de expresión de los genes de fotoperiodo y el fenotipo de las variedades, sugiriendo que el efecto de los alelos de los genes *PPD1* en la fenología se debe determinar según la presencia o ausencia de alelos insensibles al fotoperiodo como se describe en la bibliografía.

2. Futuros pasos

El identificar variabilidad alélica en los genes de vernalización (*VRN1* y *VRN2*) en las 16 variedades procedentes de una colección más amplia (cerca de 200 variedades) es de gran utilidad para realizar estudios de asociación alelo-fenotipo en toda la colección para determinar el efecto de cada alelo en fenología.. Además, estos estudios podrán ser completados con los nuevos alelos que se identifiquen cuando la secuenciación de *VRN2* se finalice.

Aunque los resultados de expresión sirven como una aproximación preliminar del funcionamiento de la red genética reguladora de la inducción floral, los estudios de expresión en un solo tejido en un único estadio son insuficientes para poder obtener conclusiones generales, por tanto, deberían completarse con más estadios de desarrollo.

CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Buylla, E. R. (2006). Unique and redundant functional domains of APETALA1 and CAULIFLOWER, two recently duplicated Arabidopsis thaliana floral MADS-box genes. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3099-3107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl081>
- Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Pozniak, C. J., Choulet, F., Distelfeld, A., Poland, J., Ronen, G., Sharpe, A. G., Barad, O., Baruch, K., Keeble-Gagnère, G., Mascher, M., Ben-Zvi, G., Josselin, A.-A., Himmelbach, A., ... Wang, L. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361(6403). <https://doi.org/10.1126/science.aar7191>
- Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J. W., & Laurie, D. A. (2007). A Pseudo-Response Regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 115(5), 721-733. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0603-4>
- Chen, A., & Dubcovsky, J. (2012). Wheat TILLING Mutants Show That the Vernalization Gene VRN1 Down-Regulates the Flowering Repressor VRN2 in Leaves but Is Not Essential for Flowering. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003134>
- Chen, F., Gao, M., Zhang, J., Zuo, A., Shang, X., & Cui, D. (2013). *Molecular characterization of vernalization and response genes in bread wheat from the Yellow and Huai Valley of China*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/199>
- Chen, L., Du, Y., Lu, Q., Chen, H., Meng, R., Cui, C., Lu, S., Yang, Y., Chai, Y., Li, J., Liu, L., Qi, X., Li, H., Mishina, K., Yu, F., & Hu, Y.-G. (2018). The Photoperiod-Insensitive Allele Ppd-D1a Promotes Earlier Flowering in Rht12 Dwarf Plants of Bread Wheat. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01312>
- Davière, J.-M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), 1147-1151. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>
- Debernardi, J. M., Woods, D. P., Li, K., Li, C., & Dubcovsky, J. (2022a). MiR172-APETALA2-like genes integrate vernalization and plant age to control flowering time in wheat. *PLOS Genetics*, 18(4), e1010157. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010157>
- Distelfeld, A., Li, C., & Dubcovsky, J. (2009). Regulation of flowering in temperate cereals. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.010>
- Distelfeld, A., Tranquilli, G., Li, C., Yan, L., & Dubcovsky, J. (2009). Genetic and Molecular Characterization of the VRN2 Loci in Tetraploid Wheat. *Plant Physiology*, 149(1), 245-257. <https://doi.org/10.1104/pp.108.129353>
- Dreccer, M. F., Fainges, J., Whish, J., Ogonnaya, F. C., & Sadras, V. O. (2018). Comparison of sensitive stages of wheat, barley, canola, chickpea and field pea to temperature and water stress across Australia. *Agricultural and Forest Meteorology*, 248, 275-294. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.10.006>
- Dubcovsky, J., Loukoianov, A., Fu, D., Valarik, M., Sanchez, A., & Yan, L. (2006b). Effect of Photoperiod on the Regulation of Wheat Vernalization Genes VRN1 and VRN2. *Plant Molecular Biology*, 60(4), 469-480. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-4814-2>

- Ficco, D. B. M., & Borrelli, G. M. (2023). Nutritional Components of Wheat Based Food: Composition, Properties, and Uses. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(21). <https://doi.org/10.3390/foods12214010>
- Flohr, B. M., Hunt, J. R., Kirkegaard, J. A., & Evans, J. R. (2017). Water and temperature stress define the optimal flowering period for wheat in south-eastern Australia. *Field Crops Research*, 209, 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.04.012>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015). *Climate change and food security: risks and responses*.
- Fu, D., Szűcs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. S., von Zitzewitz, J., Hayes, P. M., & Dubcovsky, J. (2005). Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 273(1), 54-65. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1095-4>
- Gimenez, E., Pascual, L., López-Fernandez, M., Vázquez-García, J.G., García-Mondejar, M., Ruiz, M. y Giraldo, P. 2025. Breeding Potential of Spanish Bread Wheat Landraces: Genetic Variability in Vernalization and Photoperiod Sensitivity. *Frontiers in Plant Science*, En revision, 2025.
- Gomez, D., Vanzetti, L., Helguera, M., Lombardo, L., Frascina, J., & Miralles, D. J. (2014). Effect of Vrn-1, Ppd-1 genes and earliness per se on heading time in Argentinian bread wheat cultivars. *Field Crops Research*, 158, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.12.023>
- Goncharov, N. P. (2004). Response to vernalization in wheat: its quantitative or qualitative nature. *Cereal Research Communications*, 32(3), 323-330. <https://doi.org/10.1007/BF03543317>
- Herndl, M., White, J. W., Graeff, S., & Claupein, W. (2008). The impact of vernalization requirement, photoperiod sensitivity and earliness per se on grain protein content of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 163(2), 309-320. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9671-z>
- Hill, C. B., & Li, C. (2016). Genetic Architecture of Flowering Phenology in Cereals and Opportunities for Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01906>
- Kato, K., & Wada, T. (1999). Genetic Analysis and Selection Experiment for Narrow-Sense Earliness in Wheat by Using Segregating Hybrid Progenies. *Breeding Science*, 49(4), 233-238. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.49.233>
- Kim, D.-H., Doyle, M. R., Sung, S., & Amasino, R. M. (2009). Vernalization: Winter and the Timing of Flowering in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), 277-299. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113411>
- Kippes, N., Chen, A., Zhang, X., Lukaszewski, A. J., & Dubcovsky, J. (2016). Development and characterization of a spring hexaploid wheat line with no functional VRN2 genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(7), 1417-1428. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2713-3>
- Langer, S. M., Longin, C. F. H., & Wälrschum, T. (2014). Flowering time control in European winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00537>
- Levy, A. A., & Feldman, M. (2022). Evolution and origin of bread wheat. En *Plant Cell* (Vol. 34, Número 7, pp. 2549-2567). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac130>

- Levy, J., & Peterson, M. L. (1972). Responses of Spring Wheats to Vernalization and Photoperiod ¹. *Crop Science*, 12(4), 487-490. <https://doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200040029x>
- Li, C., Distelfeld, A., Comis, A., & Dubcovsky, J. (2011a). Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes. *The Plant Journal*, 67(5), 763-773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04630.x>
- Li, C., & Dubcovsky, J. (2008). Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 55(4), 543-554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03526.x>
- Li, C., Lin, H., Chen, A., Lau, M., Jernstedt, J., & Dubcovsky, J. (2019a). Wheat *VRN1*, *FUL2* and *FUL3* play critical and redundant roles in spikelet development and spike determinacy. *Development*, 146(14). <https://doi.org/10.1242/dev.175398>
- Li, C., Lin, H., Chen, A., Lau, M., Jernstedt, J., & Dubcovsky, J. (2019b). Wheat *VRN1*, *FUL2* and *FUL3* play critical and redundant roles in spikelet development and spike determinacy. *Development*, 146(14). <https://doi.org/10.1242/dev.175398>
- Li, C., Lin, H., Debernardi, J. M., Zhang, C., & Dubcovsky, J. (2024). *GIGANTEA* accelerates wheat heading time through gene interactions converging on *FLOWERING LOCUS T1*. *The Plant Journal*, 118(2), 519-533. <https://doi.org/10.1111/tpj.16622>
- Lillemo, M., & Morris, C. F. (2000). A leucine to proline mutation in puroindoline B is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(7), 1100-1107. <https://doi.org/10.1007/s001220051392>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lopes, M. S., El-Basyoni, I., Baenziger, P. S., Singh, S., Royo, C., Ozbek, K., Aktas, H., Ozer, E., Ozdemir, F., Manickavelu, A., Ban, T., & Vikram, P. (2015). Exploiting genetic diversity from landraces in wheat breeding for adaptation to climate change. *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3477-3486. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv122>
- López-Fernández, M., Chozas, A., Benavente, E., Alonso-Rueda, E., Isidro y Sánchez, J., Pascual, L., & Giraldo, P. (2024). Genome wide association mapping of end-use gluten properties in bread wheat landraces (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 118, 103956. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2024.103956>
- Ma, F., Brown-Guedira, G., Kang, M., & Baik, B.-K. (2022). Allelic Variations in Phenology Genes of Eastern U.S. Soft Winter and Korean Winter Wheat and Their Associations with Heading Date. *Plants*, 11(22), 3116. <https://doi.org/10.3390/plants11223116>
- Makhoul, M., Chawla, H. S., Wittkop, B., Stahl, A., Voss-Fels, K. P., Zetzsche, H., Snowdon, R. J., & Obermeier, C. (2022). Long-Amplicon Single-Molecule Sequencing Reveals Novel, Trait-Associated Variants of VERNALIZATION1 Homoeologs in Hexaploid Wheat. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.942461>
- Muterko, A., Kalendar, R., & Salina, E. (2016). Novel alleles of the VERNALIZATION1 genes in wheat are associated with modulation of DNA curvature and flexibility in the promoter region. *BMC plant biology*, 16 Suppl 1(Suppl 1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0691-2>

- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Sato, E., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2005). The Arabidopsis Pseudo-response Regulators, PRR5 and PRR7, Coordinately Play Essential Roles for Circadian Clock Function. *Plant and Cell Physiology*, 46(4), 609-619. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci061>
- Nishiura, A., Kitagawa, S., Matsumura, M., Kazama, Y., Abe, T., Mizuno, N., Nasuda, S., & Murai, K. (2018). An early-flowering einkorn wheat mutant with deletions of PHYTOCLOCK 1/LUX ARRHYTHMO and VERNALIZATION 2 exhibits a high level of VERNALIZATION 1 expression induced by vernalization. *Journal of Plant Physiology*, 222, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.01.002>
- Niu, J., Ma, S., Zheng, S., Zhang, C., Lu, Y., Si, Y., Tian, S., Shi, X., Liu, X., Naeem, M. K., Sun, H., Hu, Y., Wu, H., Cui, Y., Chen, C., Long, W., Zhang, Y., Gu, M., Cui, M., ... Ling, H.-Q. (2023). Whole-genome sequencing of diverse wheat accessions uncovers genetic changes during modern breeding in China and the United States. *The Plant Cell*, 35(12), 4199-4216. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad229>
- Palomino, C., & Cabrera, A. (2023). Evaluation of the Allelic Variations in Vernalisation (VRN1) and Photoperiod (PPD1) Genes and Genetic Diversity in a Spanish Spelt Wheat Collection. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16041. <https://doi.org/10.3390/ijms242216041>
- Pascual, L., Ruiz, M., López-Fernández, M., Pérez-Peña, H., Benavente, E., Vázquez, J. F., Sansaloni, C., & Giraldo, P. (2020). Genomic analysis of Spanish wheat landraces reveals their variability and potential for breeding. *BMC Genomics*, 21(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6536-x>
- Peng, J. H., Sun, D., & Nevo, E. (2011). Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Molecular Breeding*, 28(3), 281-301. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9608-4>
- Preston, J. C., & Kellogg, E. A. (2007). Conservation and divergence of *APETALA1/FRUITFULL*-like gene function in grasses: evidence from gene expression analyses. *The Plant Journal*, 52(1), 69-81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03209.x>
- Pugsley, A. (1966). The photoperiodic sensitivity of some spring wheats with special reference to the variety thatcher. *Australian Journal of Agricultural Research*, 17(5), 591. <https://doi.org/10.1071/AR9660591>
- Pugsley, A. (1971). A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 22(1), 21. <https://doi.org/10.1071/AR9710021>
- Pugsley, A. T. (1972). Additional genes inhibiting winter habit in wheat. *Euphytica*, 21(3), 547-552. <https://doi.org/10.1007/BF00039355>
- Sall, A. T., Chiari, T., Legesse, W., Seid-Ahmed, K., Ortiz, R., Van Ginkel, M., & Bassi, F. M. (2019). Durum wheat (*Triticum durum* Desf.): Origin, cultivation and potential expansion in sub-saharan Africa. *Agronomy*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/agronomy9050263>
- Seki, M., Chono, M., Matsunaka, H., Fujita, M., Oda, S., Kubo, K., Kiribuchi-Otobe, C., Kojima, H., Nishida, H., & Kato, K. (2011). Distribution of photoperiod-insensitive alleles Ppd-B1a and Ppd-D1a and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breeding Science*, 61(4), 405-412. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.61.405>
- Shaw, L. M., Li, C., Woods, D. P., Alvarez, M. A., Lin, H., Lau, M. Y., Chen, A., & Dubcovsky, J. (2020). Epistatic interactions between PHOTOPERIOD1, CONSTANS1 and

- CONSTANS2 modulate the photoperiodic response in wheat. *PLOS Genetics*, 16(7), e1008812. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008812>
- Shaw, L. M., Turner, A. S., & Laurie, D. A. (2012). The impact of photoperiod insensitive *Ppd-1a* mutations on the photoperiod pathway across the three genomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *The Plant Journal*, 71(1), 71-84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04971.x>
- Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H. J., Duveiller, E., Reynolds, M., & Muricho, G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, 5(3), 291-317. <https://doi.org/10.1007/s12571-013-0263-y>
- Skovmand, B., Reynolds, M. P., & Delacy, I. H. (2001). Mining wheat germplasm collections for yield enhancing traits. En *Euphytica* (Vol. 119).
- Smale, M., Reynolds, M. P., Warburton, M., Skovmand, B., Trethowan, R., Singh, R. P., Ortiz-Monasterio, I., & Crossa, J. (2002). Dimensions of Diversity in Modern Spring Bread Wheat in Developing Countries from 1965. *Crop Science*, 42(6), 1766-1779. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.1766>
- Szűcs, P., Karsai, I., von Zitzewitz, J., Mészáros, K., Cooper, L. L. D., Gu, Y. Q., Chen, T. H. H., Hayes, P. M., & Skinner, J. S. (2006). Positional relationships between photoperiod response QTL and photoreceptor and vernalization genes in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(7), 1277-1285. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0229-y>
- Tadesse, W., Halila, H., Jamal, M., Hanafi, S., Assefa, S., Oweis, T., & Baum, M. (2017). Role of Sustainable Wheat Production to Ensure Food Security in the CWANA region. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 5(Spl-1-SAFSAW), 15-32. [https://doi.org/10.18006/2017.5\(Spl-1-SAFSAW\).S15.S32](https://doi.org/10.18006/2017.5(Spl-1-SAFSAW).S15.S32)
- Takatsuji, H. (1998). Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 54(6), 582-596. <https://doi.org/10.1007/s000180050186>
- Takumi, S., Koyama, K., Fujiwara, K., & Kobayashi, F. (2011). Identification of a large deletion in the first intron of the *Vrn-D1* locus, associated with loss of vernalization requirement in wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss. *Genes & Genetic Systems*, 86(3), 183-195. <https://doi.org/10.1266/ggs.86.183>
- Thomas, B. (1997). *Photoperiodism in Plants*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-688490-6.X5000-1>
- Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R. P., & Laurie, D. A. (2005). The Pseudo-Response Regulator *Ppd-H1* Provides Adaptation to Photoperiod in Barley. *Science*, 310(5750), 1031-1034. <https://doi.org/10.1126/science.1117619>
- Turner, A. S., Faure, S., Zhang, Y., & Laurie, D. A. (2013). The effect of day-neutral mutations in barley and wheat on the interaction between photoperiod and vernalization. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(9), 2267-2277. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2133-6>
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., Sanchez, A., Valarik, M., Yasuda, S., & Dubcovsky, J. (2006). The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19581-19586. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607142103>

- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Fukuyama, S., Sherman, J., & Dubcovsky, J. (2004). Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *109*(8), 1677-1686. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1796-4>
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J. L., Echenique, V., & Dubcovsky, J. (2004a). The Wheat *VRN2* Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization. *Science*, *303*(5664), 1640-1644. <https://doi.org/10.1126/science.1094305>
- Yan, L., Loukoianov, A., Blechl, A., Tranquilli, G., Ramakrishna, W., SanMiguel, P., Bennetzen, J. L., Echenique, V., & Dubcovsky, J. (2004b). The Wheat *VRN2* Gene Is a Flowering Repressor Down-Regulated by Vernalization. *Science*, *303*(5664), 1640-1644. <https://doi.org/10.1126/science.1094305>
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., & Dubcovsky, J. (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(10), 6263-6268. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937399100>