



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Función del gen MADS-box *AGL19* durante el desarrollo floral de  
*Arabidopsis thaliana*.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

**ANIDIA BLANCO JARVIO**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELENA ALVAREZ-BUYLLA ROCES

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CRÉDITOS

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo económico recibido como becario por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; registro de beca 189703), y de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP), ambos durante el periodo 2005-1 a 2006-2.

El proceso de investigación fue dirigido por el siguiente Comité:

Dr. Felipe Cruz Garcia (Miembro del Jurado)

Dr. Joseph Dubrovsky (Miembro del Comité Tutorial)

Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces (Tutor Principal)

Dra. Adriana Garay Arroyo (Miembro del Jurado)

Dra. Gladis Ilina Cassab López (Miembro del Comité Tutorial)

Las fotografías de de Microscopía Electrónica de barrido fueron tomadas en la Facultad de Ciencias con el gran apoyo de la Dra. Silvia Espinosa

Las fotografías y técnica de hibridación tipo *in situ* fué realizada por el Mtro. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz

# INDICE

## Resumen

## Summary

### Introduccion

Biologia del desarrollo

Genes MADS-box en plantas

*Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

Actividad meristemática

Organización de la raíz de *Arabidopsis thaliana*

Características de la fase vegetativa y reproductiva de *Arabidopsis thaliana*

Mecanismos del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*

### ANTECEDENTES

### OBJETIVOS

### METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Análisis del fenotipo en tres líneas independientes de ganancia de función en fotoperiodo de día corto

Análisis del fenotipo de la flor en fotoperiodo de día corto

Análisis de la transición a la floración en fotoperiodo de día corto

Análisis del fenotipo de la sobre-expresión de *AGL19* en fotoperiodo de día largo

Análisis del fenotipo de la flor en fotoperiodo de día largo

Análisis de la transición a la floración en fotoperiodo de día largo

Interacción de *AGL19* con otros genes

Interacción de *AGL21* en plantas *35S AGL19*

Hibridación *in situ* de *AGL21* en plantas *35S AGL19*

Cruza de las líneas de sobre-expresión de *AGL19* y *AP14* 3 2

### RESULTADOS

Análisis del fenotipo en tres líneas independientes de ganancia de función en fotoperiodo de día corto

Análisis del fenotipo de la flor en fotoperiodo de día corto

Análisis de la transición a la floración en fotoperiodo de día corto

Analisis del fenotipo de la sobre-expresion de *AGL19* en fotoperiodo de dia largo

Analisis del fenotipo de la flor en fotoperiodo de dia largo

Analisis de la transicion a la floracion en fotoperiodo de dia largo

Interaccion de *AGL19* con otros genes

Interaccion de *AGL21* en plantas 35S *AGL19*

Hibridacion *in situ* de *AGL21* en plantas 35S *AGL19*

Cruza de las lineas de sobre-expresion de *AGL19* y *AP14* 3 2

DISCUSIONES

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

ANEXO

## RESUMEN

Los genes MADS-box juegan papeles importantes durante el desarrollo en plantas, por lo que resultan herramientas moleculares útiles para desentrañar las redes regulatorias de la diferenciación celular y morfogénesis vegetal. Un aspecto particularmente interesante del desarrollo vegetal es la transición del estado de desarrollo vegetativo al reproductivo. En *Arabidopsis* esta transición se regula por cuatro vías de inducción floral: luz (fotoperiodo), temperatura (vernalización), autónomo y giberelinas (GAA). Estas rutas convergen para regular la expresión de genes integradores que a su vez activan los genes que determinan la identidad del meristemo de inflorescencia y los meristemos florales.

En el presente trabajo se encontró que la sobre-expresión del gen MADS-box *ALG19* acelera la transición a la floración y ocasiona que las flores se desarrollan de manera aberrante, presentando características vegetativas en las estructuras florales. En algunos casos se diferencian inflorescencias a partir de los óvulos. Los efectos son más drásticos en fotoperiodo de días cortos. Las flores presentan alteraciones en el número de órganos y tricomas compuestos ectópicos en carpelos, pétalos y sépalos, y estos últimos llegan a tamaños mayores que los de flores silvestres. El carpelo se elonga, aumenta de talla y se rompe para dar paso a una inflorescencia que surge del interior. También se observaron flores con botones florales en las axilas, entre el último y penúltimo verticilo, este fenotipo es similar a plantas con pérdida de función del gen *API*. Debido a lo anterior se realizó una cruce de las líneas de ganancia de función *API* y *AGL19* esperando que en la T1 se recuperara el fenotipo silvestre y esto ocurrió casi al 100%.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el gen *AGL19* tiene una función importante en la regulación de la transición a la floración. Además, y al igual que el gen *AGL24* que ha sido identificado como un gen de floración, la expresión constitutiva de *AGL19* altera el tiempo de floración y causa una reversión del meristemo floral a meristemo de inflorescencia, sugiriendo que estos dos genes MADS-box pueden ser redundantes. Ambos genes interactúan a nivel transcripcional con el gen *API*. Este último es un gen que promueve el desarrollo floral regulando de manera negativa a *AGL24* y de acuerdo a nuestros resultados también a *AGL19*. *AGL21* también parece estar regulado positivamente por *AGL19* a nivel transcripcional durante el desarrollo de *Arabidopsis*. Una posibilidad es que *AGL19* podría estar formando tetrámeros (*in vivo*) con *AGL21*, *AGL24* y *SOC1*. *AGL21* parece ser un factor medular pues interactúa con una gran gama de proteínas.

## SUMMARY

The MADS-box genes play important roles during plant development, thus they constitute useful molecular tools to decipher the regulatory networks that underlie cell differentiation and morphogenesis in plants. A particularly interesting aspect of plant development is the transition of the vegetative developmental state to the reproductive one. In *Arabidopsis*, this transition is regulated by four routes of floral induction: light (photoperiod), temperature (vernalization), autonomous and gibberellins (GAA). These pathways converge to regulate the expression of integrative genes, that in turn activate genes that determine the identity of the meristem, of the inflorescence and of the floral meristem. The genes responsible for floral meristem determination are *LFY*, *AP1*, *CAL* and *FUL*.

In the present work it was found that the over-expression of the gene MADS-box *ALG19* accelerates the transition to the flowering stage and gives rise to aberrant flowers with vegetative attributes in the floral structures. In some cases, the inflorescences arise from the ovules. The effects are more drastic in photoperiod of short day. The flowers present alterations in the number of organs and ectopic composed trichoms in carpels, petals and sepals, and the latter grow larger than wild type flowers. The carpel breaks to yield an inflorescence that arises from the interior. Also, flowers with floral buttons in the axils were observed, between the last and penultimate verticillium; this phenotype is similar to plants with loss of function of the gene *AP1*. Given these results, a cross of the *AP1* and *AGL19* gain of function lines was carried out, expecting to recover the wild type phenotype in the T1, which happened in almost 100% of the cases.

The results obtained in this study suggest that the gene *AGL19* has an important function in the regulation of the transition to the flowering stage. Besides, similarly to the gene *AGL24* that has been identified as a gene associated to flowering, the constitutive expression of *AGL19* alters the time of flowering and causes a reversion of the floral meristem to an inflorescence meristem, suggesting that these two MADS-box genes can be redundant. Both genes interact at the transcriptional level with the gene *AP1*. The latter is a gene that promotes the floral development by negatively regulating *AGL24* and, according to our results, also *AGL19*. *AGL21* also seems to be positively regulated by *AGL19* at the transcriptional level during the development of *Arabidopsis*. One possibility is that *AGL19* could be forming tetramers (*in vivo*) with *AGL21*, *AGL24* and *SOC1*. *AGL21* seems to be a central factor that interacts with a great range of proteins.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biología del desarrollo

La diversidad de formas de los seres vivos es el resultado de procesos evolutivos mediados por los procesos de desarrollo que conectan la variación genética con aquella de las características morfológicas y fisiológicas (Álvarez-Buylla, 2000a).

Cambios en el desarrollo subyacen tras las diversas estructuras morfológicas (Vergara-Silva *et al.*, 2001). Por lo tanto, para entender como se originan las estructuras morfológicas y sus variantes es necesario comprender los procesos del desarrollo a nivel molecular.

Se ha demostrado que en estos procesos de desarrollo participan los factores de transcripción, los cuales tienen una participación fundamental. Estos pertenecen a diversas familias de proteínas que se unen a secuencias cis-regulatorias del ADN activando o reprimiendo la expresión de genes blanco. Estas familias presentan uno o más dominios conservados y con base en esto es posible agruparlas. Una de estas familias que codifican para factores transcripcionales es la familia de los genes con caja MADS (Dobley y Lukens, 1998; Davidson *et al.*, 2002).

Los genes MADS controlan distintos aspectos del desarrollo e interactúan formando redes de regulación génica (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b; Burgeff *et al.*, 2001b; Burgeff, 2001a; Vergara-Silva y Alvarez Buylla., 2001; Espinosa-Soto, Padilla-Longoria & Alvarez-Buylla 2004). Para dilucidar estas redes es necesario avanzar en el estudio de la actividad de los genes y sus interacciones para así conjuntar una visión integral de los procesos de desarrollo.

La genética molecular del desarrollo ha permitido la caracterización de genes involucrados en la regulación de procesos ontogénéticos. Esto ha sido posible gracias al uso de mutantes con defectos específicos en su desarrollo (Sheres y Wolkenfelt, 1998). El

análisis de un gen en estos procesos se puede dar de dos maneras. La “clásica” se basa en la identificación de un fenotipo mutante, y en la localización posterior del gen interrumpido que causa dicho cambio en el desarrollo. La “inversa” parte de la interrupción o sobre-expresión de un gen cuya secuencia es conocida para analizar posteriormente el fenotipo resultante

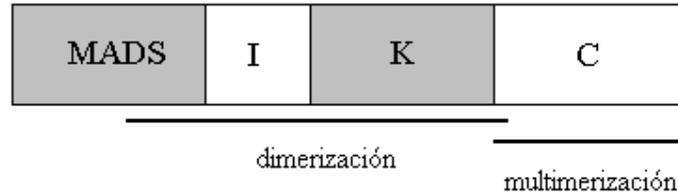
## 1.2 Genes MADS-BOX en plantas

Los genes de la familia MADS codifican para factores transcripcionales que son importantes en el desarrollo de eucariontes y en particular de plantas como el sistema experimental, *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*). Los miembros de esta familia codifican para proteínas que comparten un dominio de unión a ADN denominado MADS. Este dominio consta de alrededor de 60 aminoácidos (Coen y Meyerowitz, 1991). El nombre de esta familia es un acrónimo que se debe a las iniciales de los primeros genes aislados: *MCMI* de levaduras (*Sacharomyces cerevisiae*), *AG* de plantas (*A. thaliana*), *DEFA* también de plantas (*Antirrhinum majus*) y *SRF* de animales (*Homo sapiens*) (Yanofsky y Meyerowitz, 1991). Las proteínas MADS (en plantas) reconocen una secuencia consenso conocida como caja CArGT, en ella se unen a las secuencias regulatorias de los genes blanco y regulan su expresión. Estas proteínas también pueden actuar en combinación con otras proteínas MADS para formar complejos homo y heterodiméricos (Messenguy y Dubois, 2003).

En los eucariontes esta familia se divide en dos clados principales, que son el resultado de una duplicación génica ancestral anterior a la divergencia de animales y plantas (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a). Uno de estos clados agrupa a los genes tipo I (SRF-like) y el otro a los genes tipo II (MEF-like). Las proteínas MADS tipo II en plantas, presentan una estructura modular denominada MIKC este nombre está dado por sus cuatro regiones características (Figura 1).

La región M (dominio MADS) participa en la dimerización y unión al ADN de genes blanco. El dominio K (Keratine like) interviene en las interacciones proteína-proteína mediante la formación de estructuras helicoidales, y la región I (Intermediaria)

parece también estar relacionada con interacciones proteína-proteína. Por último está la región C (Carboxilo terminal), la cual es considerada como el dominio de transactivación aunque también puede ser importante en determinar la especificidad de las interacciones entre proteínas (Reichmann and Meyerowitz, 1997; Vergara-Silva *et al.*, 2000; Jack, 2001; Ng y Yanofsky, 2001).



**Figura 1.** Organización modular de los dominios de las proteínas MADS en plantas. La región denominada caja MADS de alrededor de 60 aminoácidos y la región K (keratin-like) de unos 70 aminoácidos se encuentran unidas por la región denominada I, esta última está moderadamente conservada, al final se localiza la región C que es más variable entre proteínas (Jack *et al.*, 2001 ; Ng y Yanofsky, 2001).

*AGAMOUS* fue el primer gen MADS clonado en *Arabidopsis* por tal motivo los genes de esta misma familia que fueron aislados posteriormente recibieron el nombre de *AGAMOUS LIKE* (*AGL*) y con una numeración progresiva a medida que se fueron describiendo (Smyth, 2000; Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla 2003). Conforme han sido caracterizados funcionalmente estos genes han sido renombrados de acuerdo a su función o al fenotipo de sus alelos mutantes. Estudios evolutivos de la familia de genes MADS-box en *Arabidopsis thaliana* han encontrado que los genes de esta familia se encuentran agrupados en distintos clados monofiléticos, cuyos integrantes comparten funciones y patrones de expresión similares (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla 2003).

La redundancia funcional parece ser muy importante entre miembros de esta familia de genes. Dentro del modelo ABC, se encontró que la actividad B y C necesitan, además, a los genes MADS-box *SEPALLATA 1*, *SEPALLATA 2* y *SEPALLATA 3*, los cuales son redundantes funcionalmente. El estudio aislado de cada una de estas mutantes no arrojó datos claros, pero, la construcción de una mutante triple (*sep1 sep2 sep3*) evidencia la importancia de estos genes, ya que el mutante triple tiene sépalos en todos los verticilos

de la flor (Pelaz *et al.*, 2000). Otro caso de redundancia funcional lo encontramos en silicuas, donde dos genes de la familia MADS: *SHATTERPROOF 1* y *SHATTERPROOF 2* son funcionalmente redundantes y ambos son importantes en controlar el desarrollo de la zona de dehiscencia de silicuas (Liljegren *et al.*, 2000).

El papel funcional de los genes MADS se ha estudiado principalmente durante el desarrollo floral. Estos genes son esenciales durante la morfogénesis de la flor, ya que actúan desde estadios muy tempranos de la determinación de identidad de meristemos florales y durante la especificación de la identidad de primordios de órganos florales (Rounsley *et al.*, 1995). En la flor de *Arabidopsis* y de *Antirrhinum majus* el análisis de fenotipos mutantes de estos genes dió como consecuencia un modelo denominado ABC (Coen y Meyerowitz 1991). Este describe cómo la actividad combinatoria de cinco genes regulan la identidad de los órganos florales. La activación de genes A (*APETALA1* y *APETALA2*) da como resultado la diferenciación de sépalos, de A y B (*APETALA3* y *PISTILLATA*) de pétalos, de B y C (*AGAMOUS*) de estambres y C únicamente de carpelos. Excluyendo a *APETALA2*, todos los genes ABC pertenecen a la familia multigénica MADS-box, que tiene un papel fundamental en la formación del plan corporal de las plantas (Coen y Meyerowitz 1991; Bowman *et al.*, 1993; Meyerowitz, 1994).

En el trabajo de Ambrose y colaboradores (2000) se sustenta la conservación del modelo ABC en monocotiledónes, ya que se demuestra que un gen ortólogo a los genes B de *Arabidopsis* en *Zea mays* (maíz) mantiene la misma función. También se observó la expresión de genes ortólogos a genes B en estructuras reproductivas masculinas y de genes ortólogos a genes C en estructuras femeninas en gimnospermas (Winter *et al.*, 2000). Recientemente se ha propuesto un modelo dinámico de red que involucra a los genes ABC y a otros genes. Esta red parece constituir un módulo de desarrollo robusto que subyace las decisiones combinatorias predichas por el modelo ABC de manera sólida independientemente de las condiciones iniciales y a pesar de perturbaciones cuantitativas en las interacciones de los genes que lo componen (Espinosa-Soto, Padilla-Longoria y Alvarez-Buylla, 2004). Por lo tanto, constituye una explicación a la robustez del modelo ABC y la conservación del plan estructural de la gran mayoría de las flores de las angiospermas.

El modelo ABC ha constituido una hipótesis de trabajo para poner a prueba la conservación de la base molecular del patrón floral en las angiospermas, lo que ha permitido un gran avance en el entendimiento de la morfogénesis floral. Es por eso que sería deseable encontrar modelos combinatorios parecidos en otros sistemas, que permitieran elaborar marcos conceptuales parecidos para entender el desarrollo de otras estructuras vegetales. Es posible que exista un modelo similar en otros tejidos debido a que: 1) análisis de la familia MADS sugieren que su evolución ha involucrado una diversificación funcional rápida y simultánea, tanto en estructuras vegetativas como reproductivas (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a; Burgueff *et al.*, 2001b) y 2) muchos sistemas de desarrollo se determinan por la actividad combinada de factores de transcripción (Theissen 1995).

### **1.3 *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo.**

*Arabidopsis* es una planta que se ha utilizado como sistema modelo para estudios de genética molecular del desarrollo. Esta planta es una angiosperma, miembro de la familia de las Brassicaceae. Al principio de su crecimiento mantiene hojas que forman una roseta que va de 2 a 5 cm de diámetro. En medio de la roseta surge un tallo o escapo de inflorescencia que puede alcanzar una altura de 20 a 70 cm. Las flores se forman en los meristemos aéreos y estas miden aproximadamente 3mm de largo por 1mm de ancho. El ciclo de vida es de 6 a 8 semanas y tiene una producción prolífica de semillas (5000 a 6000 semillas por planta), esto permite producir varias generaciones en poco tiempo, además es posible germinar y crecer a estas plantas en luz fluorescente, tanto en suelos como en medios de cultivo estériles. Su tamaño pequeño permite crecerla en espacios relativamente pequeños (Meyerowitz, 1989; Wilson, 2000; Weigle y Glazebrook, 2000). Esta planta produce estructuras florales que se autofecundan, lo cual permite la obtención de líneas puras y la realización de cruzas controladas si se evita la autofecundación. El estudio molecular en esta planta se ha facilitado porque tiene un genoma pequeño y solamente 5 cromosomas, con pocas secuencias repetidas (Meyerowitz, 1994).

*Arabidopsis* se puede transformar genéticamente a través de la infección con la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (Anderson y Wilson, 2000). Esta bacteria utiliza un plásmido Ti que se pueden introducir al genoma de la planta (Meyerowitz, 1989). Gracias a este método es posible alterar el genoma para obtener plantas transgénicas. De esta manera se han realizado muchos estudios de desarrollo a nivel molecular, donde se han descrito y caracterizado genes como los miembros de la familia MADS que están involucrados en el desarrollo de flores, hojas, silicuas y frutos (Rounsley *et al.*, 1995; Gu *et al.*, 1998; Ng y Yanofsky 2001).

#### **1.4 Actividad meristemática**

En los animales, tanto sus órganos como sus formas características se generan al principio de su vida, durante la embriogénesis. En cambio en las plantas, la base corporal se establece en la embriogénesis, pero la organogénesis (desarrollo de estructuras nuevas como hojas, ramas y raíces) ocurre durante toda la vida de la planta como resultado de la actividad de los meristemos (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Meyerowitz, 1997). Las plantas tienen dos tipos de meristemos apicales, el aéreo y el de raíz. Ambos están conformados por células indiferenciadas que a lo largo de la vida de la planta se dividen continuamente para dar lugar a las estructuras de la parte aérea (eje aéreo, hojas, flores, botón floral, etc) y a la raíz, que conforman el cuerpo completo de las plantas. Los meristemos son regiones que se distinguen porque en ellos hay un centro organizador de una proliferación celular activa pero con un control del desarrollo de los órganos que resulta de un balance entre la proliferación y la diferenciación celular (Van den Berg *et al.*, 1995). De acuerdo a su destino los meristemos pueden clasificarse en:

- Indeterminados - Se encuentran activos durante toda la vida de la planta, como en el caso de la mayoría de los meristemos apicales de raíz.

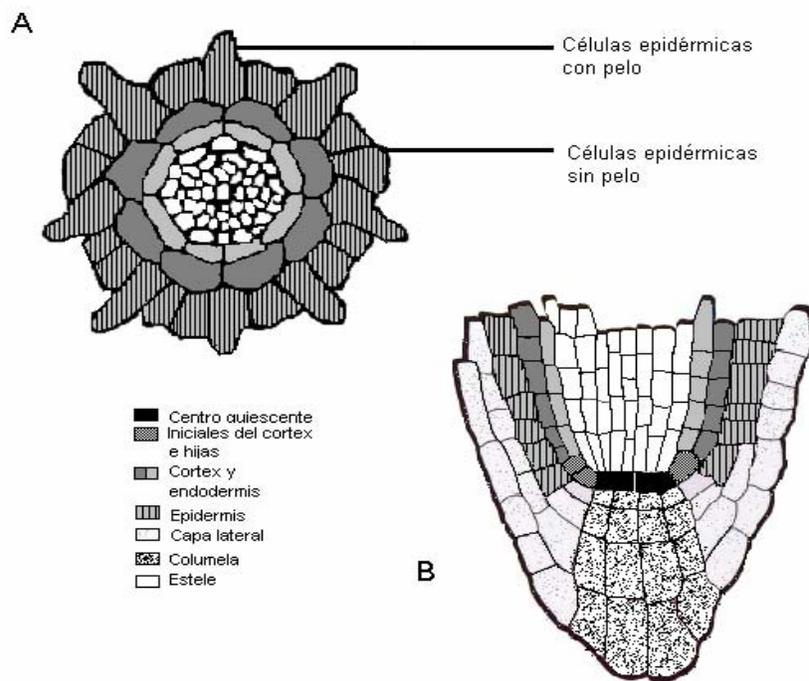
- Determinados - Estos meristemas sólo están activos durante un corto periodo de tiempo como es el caso de los que dan lugar a las hojas y a las flores (Srivastava, 2002)

Aún se desconocen los procesos que rigen la iniciación y el establecimiento del patrón radial durante la embriogénesis. Sin embargo en el desarrollo post-embriionario con análisis clonales y experimentos de eliminación celular se han demostrado que el destino de una célula se rige, en contraste con lo que ocurre en animales, por mecanismos de señalización posicional y no por su pertenencia a un linaje celular dado. De esta forma el destino final de una célula del meristemo puede modificarse si ésta es desplazada hacia una nueva posición. (Scheres *et al.*, 1994; Van den Berg *et al.*, 1995; Scheres, 1996 ; Scheres y Wolkenfelt, 1998). Con base en estos estudios de eliminación celular se sugiere que hay un mecanismo de señalización que proviene de las células ya diferenciadas que determina el tipo celular durante el desarrollo de la raíz. Además existe un mecanismo de señalización de corto alcance que parte del centro quiescente y que mantiene el status de células “madre” de las células del promeristemo de la raíz (Ban den Berg *et al.*, 1997; Scheres *et al.*, 1999). Es probable que los genes MADS-box sean parte de estos mecanismos de señalización, pues los patrones de expresión de estos genes en raíz sugieren, que podrían ser parte de mecanismos de señalización que parten de los tejidos diferenciados. Este tipo de función podría ser cumplida por genes MADS en el desarrollo del vástago aéreo.

### **1.5 Organización de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.**

La raíz primaria se forma a partir de planos de división constantes en el desarrollo embrionario, donde se forman dos células, una basal y otra apical. La primera da lugar al centro quiescente y la región de la columela, la segunda da origen a parte del meristemo de la radícula que es el cuerpo de la raíz (Hamann, 1999 ; Scheres *et al.*, 1994).

En el desarrollo post-embriionario de la raíz se puede dividir a lo largo de su eje longitudinal en tres zonas. La zona meristemática que es en donde se da la división celular. La zona de elongación que como su nombre lo indica es en donde las células continúan su crecimiento y dejan de dividirse y la zona de diferenciación que es donde se encuentra el tejido maduro y las células dejan de crecer, además se caracteriza por ser el lugar donde se producen los pelos radiculares y las raíces laterales. (Dolan 1993; Leyser y Day 2003).



**Figura 2 . Estructura de la raíz de *Arabidopsis*.** En la figura A (modificadas de Mendoza y Álvarez-Buylla, 2000) se muestra un corte transversal de la raíz de *Arabidopsis*. Figura B (modificada de Van den Berg *et al.*, 1998) distribución de las capas celulares que conforman la raíz.

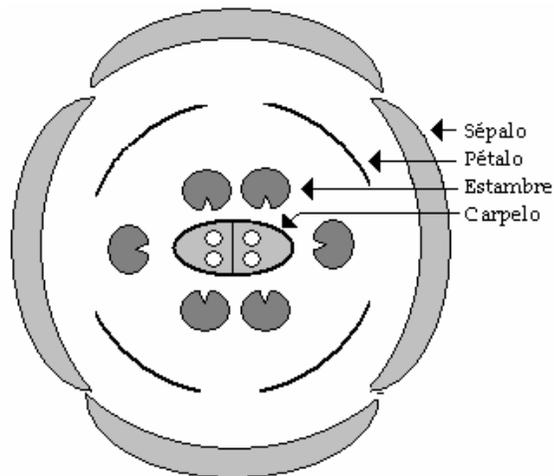
La raíz de *Arabidopsis* tiene una estructura claramente “organizada”, por lo que al verla en un corte transversal (Figura 2) es fácil distinguir los tipos celulares que forman anillos concéntricos.

La epidermis de la raíz consta de filas alternadas de dos tipos celulares: tricoblastos y atricoblastos, los primeros darán origen a células con pelo y los segundos a células sin pelo. El córtex, es importante para la determinación de identidad de tricoblastos y atricoblastos ya que, si una célula epidérmica dentro del meristemo está adyacente a una sólo célula del córtex será nombrada atricoblasto, mientras que si esta célula colinda con dos células corticales será denominada tricoblasto. Al centro de la raíz se encuentra el cilindro central que cuenta con una capa (llamada periciclo) que lo rodea. El cilindro central está conformado por los tejidos del xilema y el floema y tejidos acompañantes (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1994; Dolan y Okada, 1999).

La organización de la raíz está bien estudiada a nivel celular y se han analizado los patrones de cada tejido que la conforman, por lo que cambios fenotípicos producidos por mutantes pueden ser caracterizados a nivel celular. Esto ha sido más difícil en el vástago aéreo en donde la estructura celular es más complicada.

## **1.6 Características de la fase vegetativa y reproductiva de *Arabidopsis thaliana***

Las fases vegetativa y reproductiva de *Arabidopsis* están separadas temporalmente. La fase vegetativa se caracteriza por la producción de hojas de roseta y hojas caulinas dispuestas en filotaxia espiral, con pequeños internodos entre hojas sucesivas (Bowman, 1994). Ambos tipos de hojas presentan tricomas compuestos en la superficie abaxial y adaxial. La transición de estadio vegetativo a reproductivo está controlado por factores tanto endógenos como ambientales que determinan el momento en el cual el meristemo apical que produce hojas en la fase vegetativa cambia a meristemo de inflorescencia en la fase reproductiva. La transición floral ocurre cuando el meristemo cambia de indeterminado (meristemo de inflorescencia) a determinado (meristemo floral). Los primordios florales se inician uno a cada costado del meristemo vegetativo apical y se desarrollan después los órganos florales en cada uno (Simpson *et al.*, 1999).



**Figura 3. Organización de los verticilos florales.** En las plantas de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* se conserva esta organización que rodea a los dos carpelos fusionados.

Las flores maduras de *Arabidopsis* tienen una estructura simple típica de las Brassicaceae (Figura 3). Las flores tienen un cáliz con cuatro sépalos y una corola con cuatro pétalos, los cuales tienen una posición alternada en el interior de la flor con respecto a los sépalos. Estos últimos al igual que las hojas presentan tricomas pero estos son sencillos y sólo se localizan en la superficie adaxial. Los estambres se localizan rodeando al gineceo, el cual se localiza en el centro de la flor y está compuesto por dos carpelos (Bowman 1994).

Cada uno de los cuatro tipos de órganos florales (sépalos, pétalos, estambres y carpelos) de *Arabidopsis* tienen características morfológicas distintivas en la epidermis, como el tamaño de las células, la forma y la textura. Los pétalos tienen un color blanco debido a altas magnificaciones céricas las cuales cubren las superficies abaxiales y adaxiales, la cutícula gruesa de las células sobre la superficie adaxial está organizada a lo largo de ejes cónicos de las células. Ambas superficies en el pétalo no presentan estomas. La superficie de los sépalos maduros tiene a lo largo de su epidermis diversos tipos celulares, este presenta células con formas irregulares las cuales tienen diferentes tamaños, pueden ser chicas ó alargadas, células guarda y estomas. Las anteras tienen una epidermis con células rugosas con formas irregulares pero con un tamaño uniforme. El gineceo presenta en la parte superior papilas estigmáticas, células largas, estomas en el estilo y pequeñas células epidérmicas en las dos valvas del ovario (Bowman 1994)

## 1.7 Mecanismos involucrados en la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*

La determinación del tiempo de floración depende del establecimiento de interacciones a diferentes niveles que implican desde el control del ciclo celular, la organización y actividad del meristemo, la diferenciación celular, hasta una serie de señales endógenas y exógenas (Parcy 2005).

En la transición del crecimiento vegetativo al desarrollo reproductivo de *Arabidopsis thaliana* se conocen cuatro vías principales de señalización que inducen la floración: respuesta al ácido giberélico, autónoma, vernalización y fotoperíodo. Las dos últimas son dependientes de las condiciones externas (Mockler *et al.*, 2004; Komeda 2004). Estos caminos convergen para regular la expresión de pequeños grupos de genes críticos para la iniciación a la floración en diferentes caminos de transducción de señales que pueden interactuar para guiar el tiempo de floración. La acción de esta señalización resulta en la alteración de la expresión de genes por mecanismos que incluye la regulación transcripcional (Mockler *et al.*, 2004). Creemos que los genes MADS-box son parte crucial de un módulo de desarrollo o red de interacciones genéticas que subyace tras la transición del estado vegetativo al reproductivo. Este módulo podría actuar como integrador de las distintas vías que responden a los estímulos externos e internos que activan dicha transición.

- o Giberelinas: Se sabe que las giberelinas biológicamente activas promueven diversos procesos que incluyen: la expansión de la hoja, elongación del tallo, iniciación floral, desarrollo de los órganos florales, germinación de las semillas y desarrollo de frutos (Davies, 1995). Las giberelinas interactúan con otras hormonas para regular diferentes procesos de desarrollo (Fu y Harberd, 2003). Se ha visto que los genes homeóticos son blanco de las giberelinas durante el desarrollo floral. La base molecular de la respuesta a giberelinas a la floración se ha estudiado por medio del aislamiento de genes que se inducen o reprimen en mutantes insensibles a giberelinas. Los genes homeóticos florales son blanco de las giberelinas durante el desarrollo floral, ejemplo de esto son los mutantes de los genes *AP3* (*APETALA3*), *PI*

(*PISTILLATA*), *AG* (*AGAMOUS*) (Yu *et al.*, 2004). *SOC1* (*SUPPRESSOR OF CONSTANS OVEREXPRESSION*) y *LFY* (*LEAFY*) (Puterill *et al.*, 2004)

- o Vernalización: En este proceso se da una aceleración en el tiempo de floración en respuesta a períodos prolongados a bajas temperatura. La vernalización es equivalente al proceso que ocurre a las plantas durante el invierno donde por semanas se ven sometidas a temperaturas bajas. La base molecular de la vernalización, se ha explorado a través de el aislamiento de mutantes que muestran defectos en la respuesta a la vernalización (Boss *et al.*, 2004; Amasino 2005; Yu *et al.*, 2004).
- o Fotoperiodo: Se refiere a la duración del día. El fotoperiodo es un factor ambiental que afecta el tiempo de floración debido a que las plantas florecen más rápido en días largos que en días cortos y la señal primordial involucrada en esta respuesta es la luz (Michaels *et al.*, 2005; Halliday *et al.*, 2003).
- o Autónoma: Es independiente de los factores ambientales (Michaels y Amasino 1999). El gen *FLC* es el actor que se encuentra arriba de la cascada de regulación de la vía autónoma y también este es el punto de convergencia del camino autónomo y de la vernalización (Parcy 2005). Este ejemplo indica como suceden múltiples interacciones interdependientes que forman una red de conexiones entre las diferentes vías, a través de la cual se dan diversas respuestas cuantitativas integradas (Mendoza *et al.*, 1999).

Los análisis genéticos de un gran número de mutantes del tiempo de floración han modelado la descripción de una red integrada de caminos que controlan la transición a la floración. La actividad de expresión de algunos genes que causan la transición a la floración (por diferentes caminos y diferentes inducciones con otros genes) han sido llamados “integradores de rutas florales” e incluyen a *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), *SOC1* (*SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*) y *LFY* (*LEAFY*) (Boss *et al.*, 2004). En la actualidad el análisis de mutantes dobles muestran que estos tres integradores tienen funciones independientes parcialmente que determinan el tiempo y la iniciación de

la floración. Análisis de expresión muestran que *FT* regula la expresión de *SOC1*, y *SOC1* a su vez regula la expresión de *LFY* (Moon *et al.*, 2005).

Se han identificado un set de genes denominados “**Floral Meristem Identity**” (FMI). Estos genes de *identidad del meristemo floral* promueven el establecimiento y mantenimiento de la identidad del meristemo floral. Sin su actividad el meristemo floral se desarrolla con inflorescencias aberrantes. Este grupo de genes incluyen a *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)* y *CAULIFLOWER (CAL)* (Yu *et al.*, 2004 and Parcy 2005). Estos genes promueven el desarrollo floral regulando positivamente algunos genes que activan el desarrollo de la floración, pero también pueden dar esta regulación de manera negativa, como es el caso de *AGL24*, el cual es un blanco de la represión transcripcional de *LFY* y *AP1*. *AGL24* es un gen que promueve el destino del meristemo de inflorescencia. Su expresión ectópica tiene una regulación central en la identidad meristemática de flor ya que este gen causa una reversión del meristemo floral al meristemo de inflorescencia (Yu *et al.*, 2004).

## 2. ANTECEDENTES

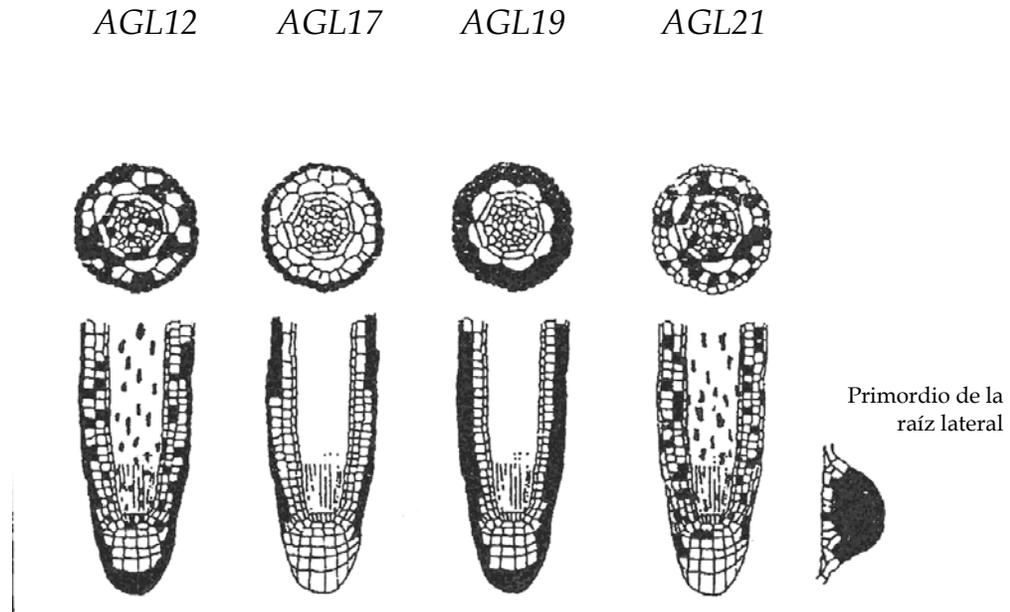
Los miembros de la familia MADS-box hasta ahora caracterizados funcionalmente nos muestran como juegan papeles importantes en el desarrollo de plantas. Los esfuerzos dirigidos a identificar a los distintos miembros de esta familia génica llevaron al descubrimiento de genes MADS con expresión fuera de los tejidos florales.

Hasta ahora se ha visto que el sitio de expresión de ARNm está correlacionado con el sitio en donde la función del gen es importante (Rounsley *et al.*, 1995; Zhang y Forde, 1998; Álvarez-Buylla, 2000b; Zhang y Forde 2000, Burgeff *et al.*, 2001b). Por lo tanto, como un primer paso para explorar la función de genes MADS-box en el desarrollo, se analizaron (En el laboratorio de Genética Molecular Evolución y Desarrollo en plantas, Instituto de Ecología. UNAM) los patrones de expresión de ARNm de un conjunto de genes de esta familia que se expresan preferencialmente en tejidos vegetativos, en particular en la raíz de *Arabidopsis*. Para esto se realizaron análisis de hibridación *in situ* (figura 4) de raíz para los genes, *AGL19* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b), *AGL17*, *AGL12*, *AGL21* (Burgeff *et al.*, 2001b) *AGL 14* y *ANR1* (Datos aún no publicados de Álvarez-Buylla).

El gen *AGL19*, se localiza en el cromosoma IV de *Arabidopsis* y codifica para una proteína de 219 aminoácidos. Forma parte del clado conformado por *AGL14*, *AGL42*, *AGL71*, *AGL72* y *AGL20* (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla 2003). Comparte poco más del 70% de similitud en secuencia de aminoácidos de la región MIK con *AGL14*, que parece ser su gen hermano con el cual comparte dentro del genoma de *Arabidopsis* el gen ancestral más cercano.

La expresión de *AGL19* se localiza en la columela, la cofía lateral y las células epidérmicas de la región del meristemo tanto de las raíces laterales como de la raíz primaria. En las regiones de la raíz diferenciada la expresión se observó en el cilindro central pero no en las células de la endodermis, cortex y epidermis (Alvarez-Buylla *et al.*,

2000b). Además de estos experimentos *in situ*, también se realizaron RT-PCR's para determinar el sitio de expresión de algunos genes MADS. Se encontró que *AGL19* además de tener una fuerte expresión en raíz también la tiene en otros órganos de la planta (figura 4). Los genes *AGL21*, *ANR1*, *AGL17*, *AGL16*, *AGL14*, *AGL19* y *AGL42*, a pesar de expresarse en otros órganos mantienen una expresión preferencial en raíz (Blanco-Jarvio 2004).

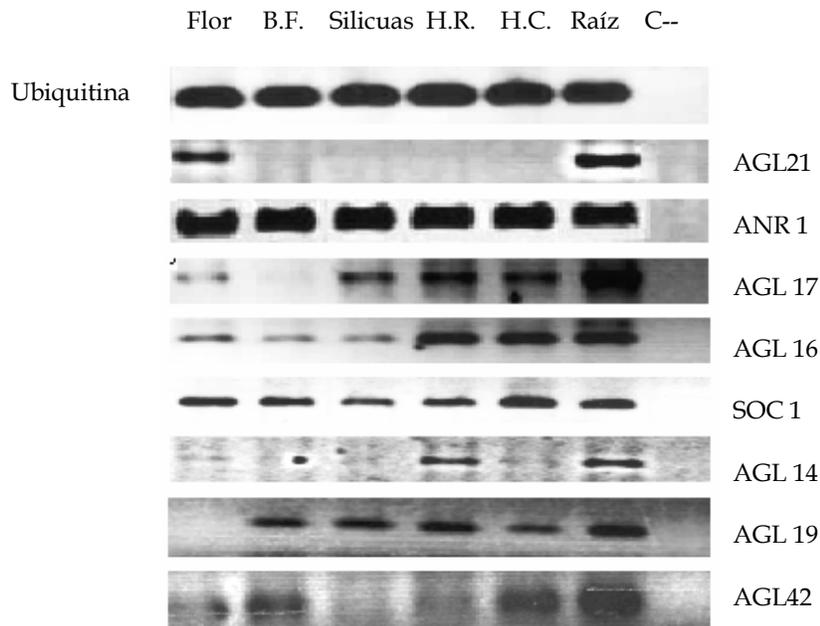


**Figura 4.** Esquema de los patrones de expresión los genes *AGL12*, *AGL17*, *AGL19* y *AGL21*, en meristemo apical y primordio de la raíz lateral de *Arabidopsis* (modificado de Burgeff 2001a).

El análisis individual de cada uno de los miembros de la familia MADS es importante para posteriormente hacer una integración de la función de estos genes en el desarrollo de *Arabidopsis*. Con el objetivo de analizar la función del gen *AGL19* en el laboratorio de Genética Molecular, Evolución y Desarrollo en plantas (Instituto de Ecología, UNAM) se hicieron construcciones de la secuencia del ADNc de *AGL19* unido a un cassette que lleva dos copias del promotor 35S (promotor del virus del mosaico de la coliflor). Con esta construcción denominada pRT153 se transformó la cepa AGL0 de *Agrobacterium tumefaciens*, para posteriormente transformar plantas silvestres de *Arabidopsis* ecotipo Columbia, empleando la técnica de infiltración con *A. tumefaciens*. Este vector posee una secuencia de resistencia a kanamicina que permite la selección mediante este

antibiótico, durante el desarrollo experimental se seleccionaron 3 líneas homocigotas independientes. Estas líneas fueron denominadas como *35S::AGL19.1*, *35S::AGL19.2* y *35S::AGL19.3*.

Estudios recientes de dos líneas de pérdida de función de *AGL19* mostraron que la raíz presenta alteraciones en la organización de las capas que conforman la columela, además de tener una longitud significativamente menor de la zona de elongación y de la zona de crecimiento con respecto al tipo silvestre (datos no publicados). Los fenotipos del vástago aéreo y de las flores de estas líneas no son muy aparentes aunque parece estar involucrado en el control de la transición a la floración.



**Figura 5. Patrón de expresión de ARNm de genes MADS-box de los clados de *SOC1* y *ANR1* en diferentes tejidos de *Arabidopsis* mediante RT-PCR.** Amplificación de ADNc en diferentes órganos de la planta de los genes *AGL21*, *ANR1*, *AGL17*, *AGL16*, *SOC1*, *AGL14*, *AGL19* y *AGL42*. Muestras de izquierda a derecha de Flor, Botón Floral, Silicuas, Hoja de Roseta, Hoja Caulina, Raíz y el control negativo que contiene agua en lugar de ADNc.

En estudios de dos híbridos se vieron las interacciones proteicas de los genes MADS. La proteína del gen *AGL19* interactúa con las proteínas de los genes *AGL20* y *AGL21* (de Folter et al., 2005), estos datos son importantes ya que nos arrojan evidencias

sobre los dímeros o heterodímeros funcionales que pueden estar ocurriendo “*in vivo*” en la planta. Sin embargo no se debe descartar la posible interacción de estas proteínas en tetrameros, ya que se sabe que son este tipo de uniones de proteínas MADS las que determinan la identidad de los órganos florales (Jack 2001). En estudios anteriores por Northern blot se encontró que *AGL21* se expresa de manera ectópica en plantas *35S::AGL19* (Datos no publicados).

En esta tesis nos centramos en el análisis funcional de *AGL19* en el desarrollo del vástago aéreo y sus posibles interacciones con otros genes de la misma familia con los que puede interactuar este gen. El papel de este durante el desarrollo de raíz se está analizando como parte del trabajo doctoral de otro estudiante del laboratorio.

### 3. OBJETIVOS

#### Generales:

- Estudiar la función del gen *AGL19* en *Arabidopsis* así como su relación funcional con otros genes MADS.

#### Particulares:

- Analizar el fenotipo de sobre-expresión de *AGL19* en tres líneas independientes en fotoperiodo de días cortos.
- Determinar si el fenotipo de estas líneas de sobre-expresión se mantiene en fotoperiodo de días largos y seleccionar una línea para los análisis de transición a la floración.
- Análisis de la interacción de *AGL19* con otros genes.

## **4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **4.1 Análisis del fenotipo en tres líneas independientes de ganancia de función en fotoperíodo de día corto.**

#### **4.1.1 Análisis del fenotipo de la flor en fotoperiodo de día corto.**

Se sembraron en suelo (medio metro-mix 200) semillas de las tres líneas de ganancia de función de *AGL19*, después fueron colocadas en un cuarto de crecimiento con fotoperiodo de días cortos (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) a una temperatura constante de 21°C. Cuando las flores abrieron se colectaron para tomar las fotografías en un microscopio estereoscópico (OLYMPUS SZ-PT). Para conocer con más detalle las alteraciones en las células de los órganos florales de estas plantas también se realizaron fotografías con microscopía electrónica de barrido (Trabajo realizado con Silvia Espinoza, Laboratorio de microscopía electrónica de barrido en la Facultad de Ciencias, UNAM). La colecta (flores y botones florales) se fijó en FAA y se deshidrató (cuando las muestras estuvieron en alcohol al 70% se disectaron) hasta alcohol absoluto, el cual posteriormente fue sustituido por CO<sub>2</sub> con un desecador de punto crítico (BAL-TEC CPD030), Una vez realizado lo anterior las muestras fueron montadas y sometidas a baño de oro mediante una ionizadora (Densovaccum. Desk 11). Finalmente se tomaron fotografías a diferentes aumentos con un microscopio electrónico de barrido (JEONE JSM-5310 LV).

#### **4.1.2 Análisis de la transición a la floración en fotoperiodo de día corto.**

Se esterilizaron, vernalizaron y sembraron (ver protocolo en el anexo) 35 semillas de las líneas transgénicas *35S::AGL19.1*, *35S::AGL19.2*, *35S::AGL19.3* y el tipo silvestre (*wt*) en suelo (metro-mix 200). Estas semillas fueron colocadas en una cámara de crecimiento con temperatura constante de 21°C con fotoperiodo de días cortos (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad).

Para hacer el análisis de la transición a la floración se hicieron tres tipos de análisis, 1) se registró el día en el cual el escapo de las plantas llegó a 1cm de longitud (tiempo de emergencia del escapo, 2) en ese mismo día se contaron el número de hojas de roseta que tenía la planta y 3) se registro el día en el cual abrió la primer flor. Con estos datos se hicieron comparaciones entre las plantas transgénicas y las silvestres. Se graficaron los promedios en el programa Sigma plot versión 5.0.

## **4.2 Análisis del fenotipo de la sobre-expresión de *AGL19* en fotoperiodo de día largo.**

### **4.2.1 Análisis del fenotipo de la flor en fotoperiodo de día largo.**

### **4.2.2 Análisis de la transición a la floración en fotoperiodo de día largo.**

Estos dos últimos puntos siguieron el mismo procedimiento de los puntos 4.1.1 y 4.1.2, lo único que se varío fue el fotoperiodo que para esta parte fue de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

## **4.3 Interacción de *AGL19* con otros genes.**

### **4.3.1 Interacción de *AGL21* en plantas *35S::AGL19*.**

Se esterilizaron y vernalizaron (ver protocolo en el anexo) semillas de plantas silvestres de *Arabidopsis*, posteriormente se sembraron en medio de cultivo sólido (MS) y se crecieron en fotoperiodo de días largos (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con una temperatura de 21°C. A los 16 días de edad se colectó tejido de la parte aérea y se extrajo ARN total utilizando el reactivo TRIZOL (ver protocolo en el anexo).

Posteriormente se utilizó la técnica de RT-PCR (ver anexo), la cual consiste en sintetizar ADNc a partir de ARNm mediante la enzima “reverso transcriptasa” (RT) y un cebador (oligonucleótido) que se une a la cola polyA característica del ARNm en eucariontes. Una vez que el ADNc está sintetizado se realiza un PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y se amplifica el gen de interés, con oligonucleótidos específicos. Como control de ARN se utilizaron oligos para amplificar Tubulina (ver secuencias y programas de PCR en el anexo).

#### **4.3.2 Hibridación *in situ* de AGL21 en plantas 35S::AGL19**

Esta parte experimental de la hibridación *in situ* no la realice completa, a continuación se especifica mi trabajo. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para AGL21, posteriormente se hizo un alineamiento (en la pagina de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para corroborar que el fragmento amplificado a partir de estos oligonucleótidos sólo se unía a AGL21 (ver oligonucleótidos OINSITU21F y OEAB167 en anexo).

Se sembraron en suelo (medio metro-mix 200) semillas de 35S:AG19.2 y *wt*, estas fueron colocadas en un cuarto de crecimiento con fotoperíodo de días cortos. Cuando emergió el escapo se colectó material y se fijó en FAA, posteriormente se deshidrató hasta alcohol al 100%, cuando las muestras se encontraban en alcohol absoluto se empezó a sustituir este con Xileno hasta llegar al 100% de concentración (a partir de esta parte el trabajo experimental fue terminado por R. Pérez-Ruiz), finalmente esta última substancia se sustituyo por paraplast. Estas muestras se montaron y cortaron (en microtomo). Posteriormente se hizo la hibridación con una sonda de AGL21 marcada con digoxigenina para ver si se tenía señal de la expresión de AGL21.

### 4.3.3 Cruza de las líneas de sobre-expresión de *AGL19* y *AP1*

Se realizó una cruce de *35S::AGL19.2* y *35S::AP1*, usando como planta receptora del pólen a la línea de sobre-expresión de *AGL19*, debido a que se encontraba en mejores condiciones. Se abrieron tres flores de la línea *35S::AGL19.2* y se quitaron las anteras (estructuras donde se almacena el pólen) para evitar que la planta se autofecundara. Se hicieron revisiones periódicas y cuando las papilas estigmáticas estuvieran receptivas se polinizó con polen de flores *35S::AP1*. Se dejó que la flor madurara hasta formar las silicuas (vainas donde se encuentran las semillas), una vez secas se colectó la semilla (generación T1, donde todas las semillas son heterocigotas) la cual fue sembrada en suelo (Metro mix 200) y se crecieron en fotoperiodo de días cortos (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad) con una temperatura de 21°C.

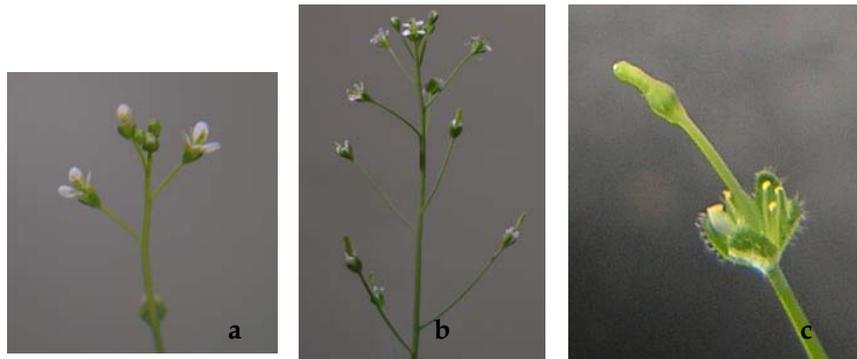
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis del fenotipo en tres líneas independientes de ganancia de función en fotoperíodo de día corto.

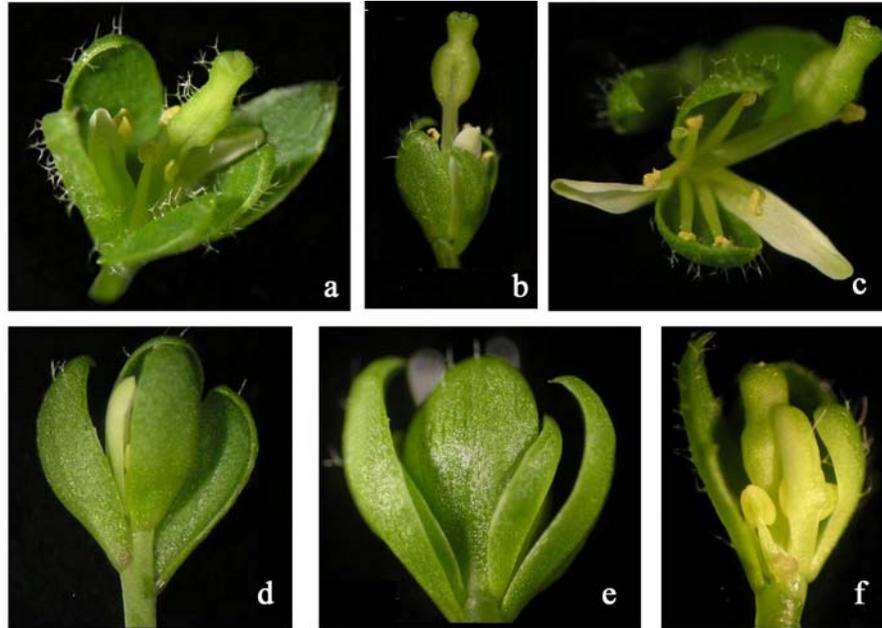
#### 5.1.1 Análisis del fenotipo de la flor en fotoperíodo de día corto.

Las flores de las líneas de sobre-expresión muestran un fenotipo aberrante, el cual es notable a simple vista. En la figura 6 se muestra el tallo principal (a y b) del tipo silvestre y de la línea *35S::AGL19.2*, haciendo un acercamiento (figura 6 c) se observa que en las flores el tallo se elonga por debajo del carpelo, llevándolo por encima de los sépalos, pétalos y estambres (figura 7a, b, c y f). Esta característica fue constante en todas las flores revisadas de las líneas *35S::AGL19.1* y *35S::AGL19.2*.

Las flores de las tres líneas de sobre-expresión muestran diversas alteraciones, en algunas se observa un mayor número de sépalos y estambres (figura 17 a y c) y en otras se puede apreciar la ausencia de pétalos (figura a, b, c, d y f). Se observaron un gran número de plantas con botones florales en las axilas, entre el último y penúltimo verticilo. Este fenotipo es similar a plantas con pérdida de función del gen *APETALA 1 (AP1)* (Ferrario et al., 2004).



**Figura 6. Comparación de flores de las líneas de sobre-expresión y *wt*.** a) tipo silvestre, b) tallo principal de la línea *35S::AGL19.2* y c) acercamiento de una flor de la planta b.

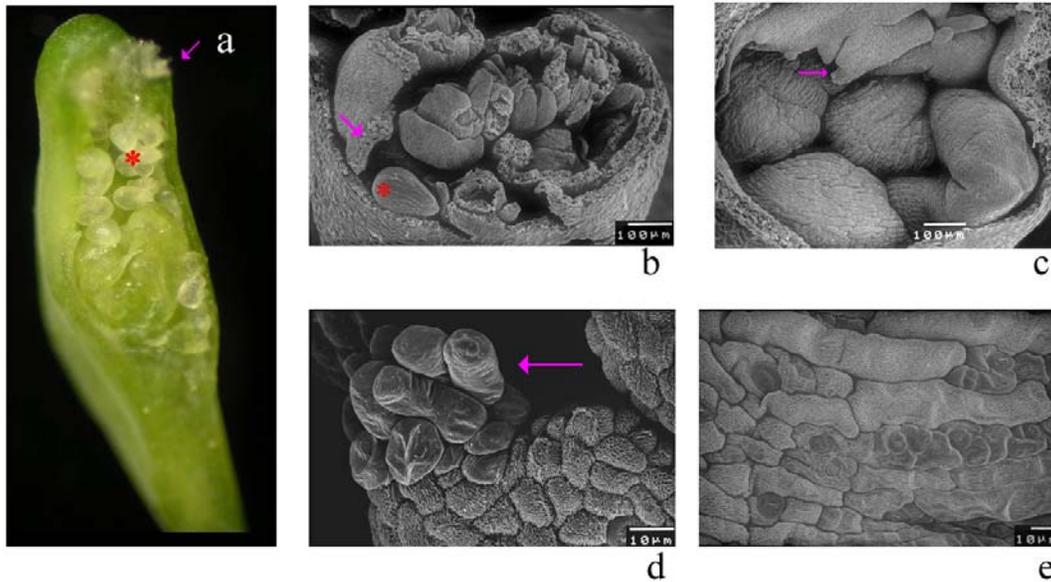


**Figura 7. Variedad de fenotipos en las líneas 35S::AGL19.1 y 35S::AGL19.2.** a), b) y e) 35S::AGL19.1. d), c) y f) 35S::AGL19.2.

En todos los casos de flores revisadas de las líneas 35S::AGL19.1 y 35S::AGL19.2 se encontró que los carpelos se hacen mas redonditos y se abultan (figura 7 a, b, c y f), esto se debe a que dentro se desarrolla una “inflorescencia” (figura 8).



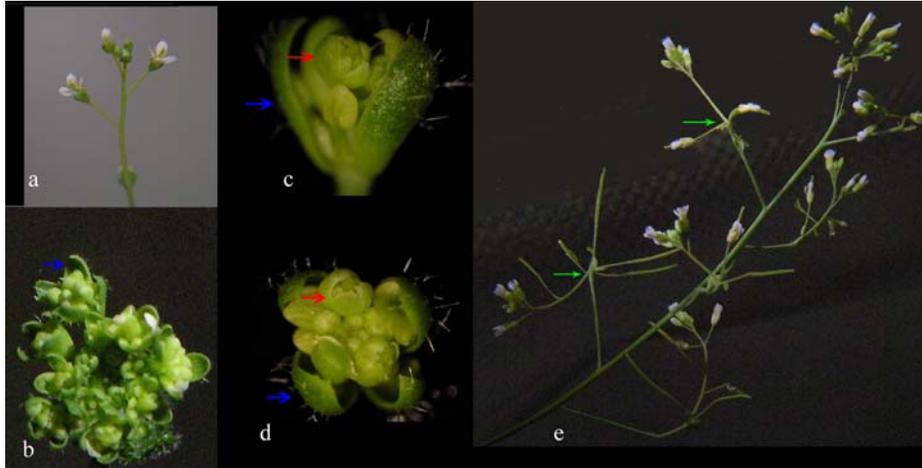
**Figura 8. Serie de desarrollo de un carpelo de línea 35S::AGL19.2.** El carpelo se abre y posteriormente surgen flores.



**Figura 9. Desarrollo en el interior del carpelo de las líneas 35S::AGL19.1 y 35S::AGL19.2.** a) y b) 35S::AGL19.1. c), d) y e) 35S::AGL19.2. Los óvulos se indican con asteriscos rojos y las papilas estigmáticas con flechas rosas. La imagen e) es un aumento de la imagen c).

Dentro de estos carpelos deformes se observan óvulos normales (figura 9 a y b), sin embargo como se puede apreciar en la figura 9c también se ven órganos parecidos a sépalos, la imagen 9e muestra un acercamiento a estas células con identidad celular de sépalos. Las fotos 9 a, b, c y d presentan células con identidad de papilas estigmáticas.

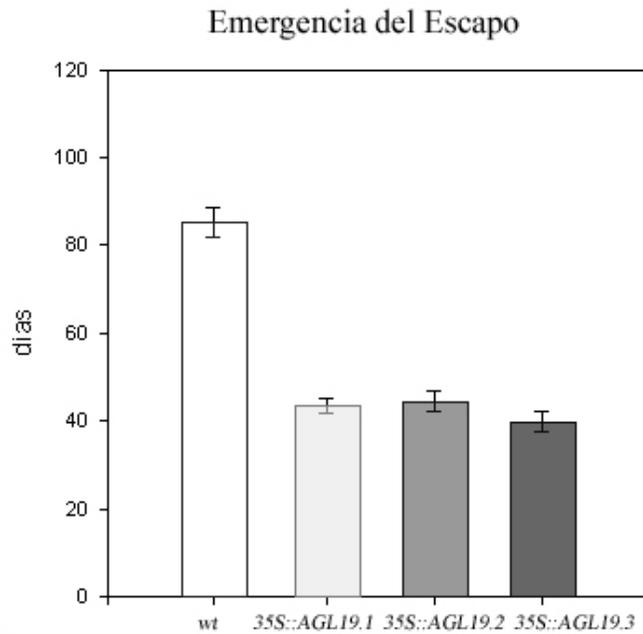
La línea 35S::AGL19.3 muestra un fenotipo similar al de las líneas 35S::AGL19.1 y 35S::AGL19.2, sin embargo el fenotipo es más drástico. Durante el desarrollo de estas plantas se observan aglomeraciones de estructuras parecidas a flores (figura 10 b, d y d) las cuales tienen un desarreglo de los verticilos en su interior, se pueden observar algunas veces anteras y pétalos, sin embargo en todas las inflorescencias revisadas no se encontró carpelo sino hasta la siguiente generación de las flores que emergen de estas primeras (figura 10 e).



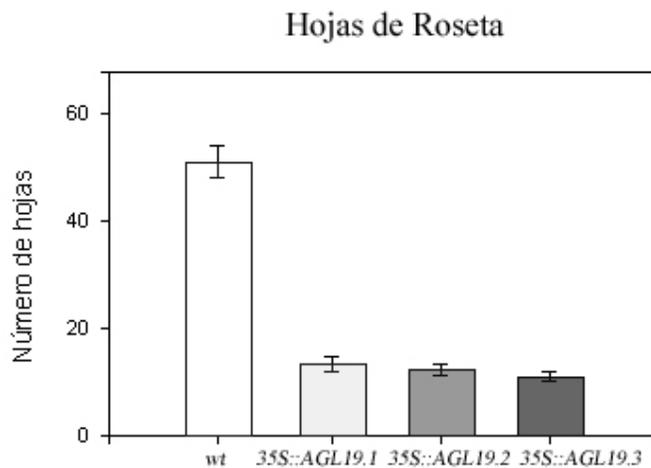
**Figura 10. Desarrollo de plantas 35S::AGL19.3.** a) fenotipo del wt, b) inflorescencia, con la flecha azul se indican los sépalos 35S::AGL19.1 c) y d) acercamiento de las flores de la imagen b, los sépalos están marcados con la flecha azul y con la flecha roja se indican los sépalos de una nueva flor. e) planta madura, la flecha verde indica el centro de donde surgen las estructuras.

### 5.1.2 Análisis de la transición a la floración en fotoperiodo de día corto.

En el análisis de transición a la floración se observaron que las diferencias entre las líneas de sobre-expresión y el tipo silvestre. Las plantas transgénicas muestran una aceleración significativa en el tiempo de floración. Las plantas del tipo silvestre florecen 20 días más tarde que las líneas de sobre-expresión (figura 11).

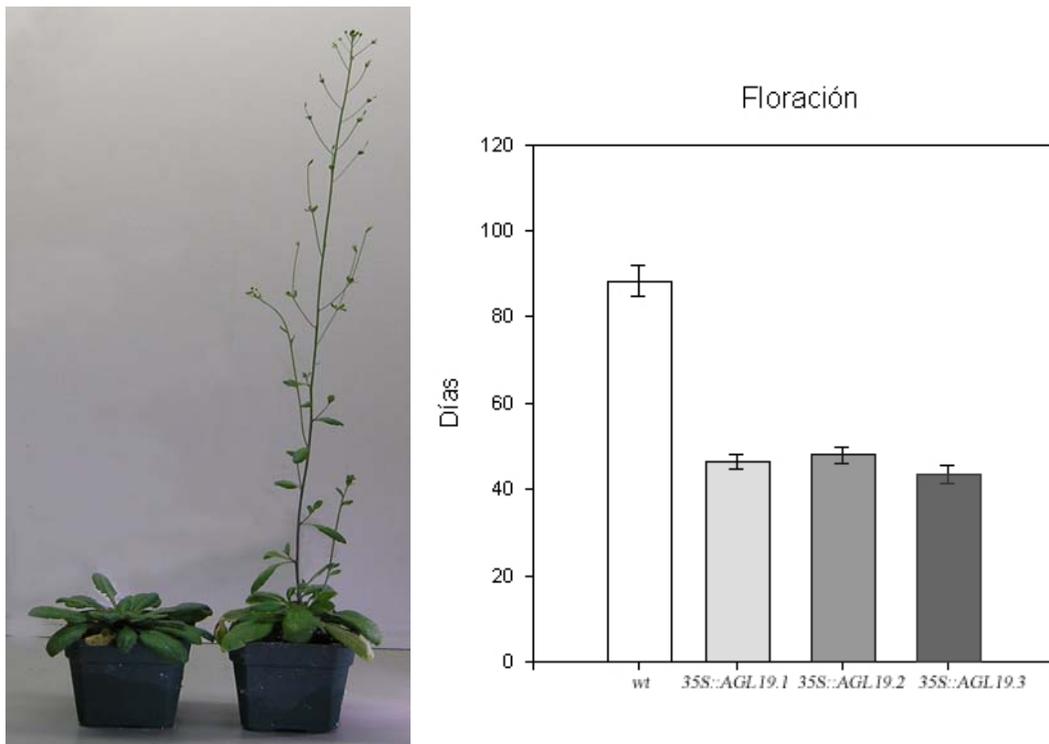


**Figura 11.** Tiempo de emergencia del escapo de la inflorescencia en plantas de las líneas de sobre-expresión y *wt*. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%, n=35.



**Figura 12.** Comparación del número de hojas de roseta entre las líneas de sobre-expresión y *wt* al momento de emergencia del escapo. Se registró el número de hojas el día en el que el tallo floral tenía 1 cm de longitud. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%, n=35.

Las gráficas del número de hojas de roseta (figura 12) y tiempo a la producción de la primera flor (figura 13) coinciden con el fenotipo de tiempo de producción del escapo e inclusive en estas se ve que la línea 35S::AGL19.3 mantiene un fenotipo (ligeramente) más temprano en la floración. El tiempo que tarda el tipo silvestre en que abra la primera flor en comparación con el fenotipo de sobre-expresión es sumamente drástico, ya que esta diferencia es de mas de 40 días (figura 13), lo cual resalta a simple vista la aceleración del tiempo de floración que tienen estas plantas transgénicas.

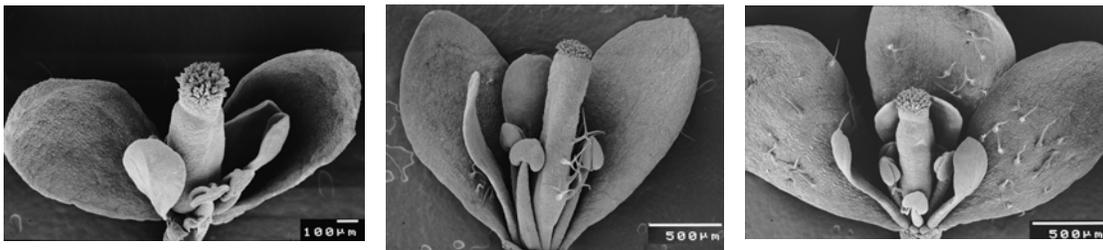


**Figura 13. Comparación del tiempo de floración de las líneas de sobre-expresión y *wt*.** Se registró el día en el que abrió el primer botón floral de las plantas. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%, n =35. La imagen de la izquierda muestra al *wt* y a la línea 35S::AGL19.3 después de 85 días a partir de la siembra.

## 5.2 Análisis del fenotipo de la sobre-expresión de *AGL19* en fotoperiodo de día largo.

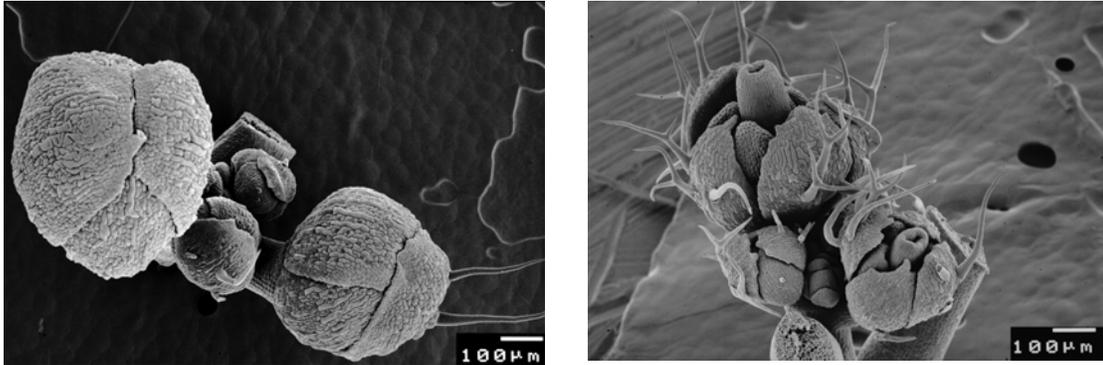
### 5.2.1 Análisis del fenotipo de la flor en fotoperiodo de día largo.

Se crecieron plantas de las tres líneas de ganancia de función de *AGL19* en fotoperiodo de día largo y se observó que las flores tienen alteraciones menos drásticas que el fotoperiodo de días cortos, sin embargo las tres líneas mantienen el mismo fenotipo (figura 14). Para los análisis posteriores se utilizó la línea *35S::AGL19.2*.

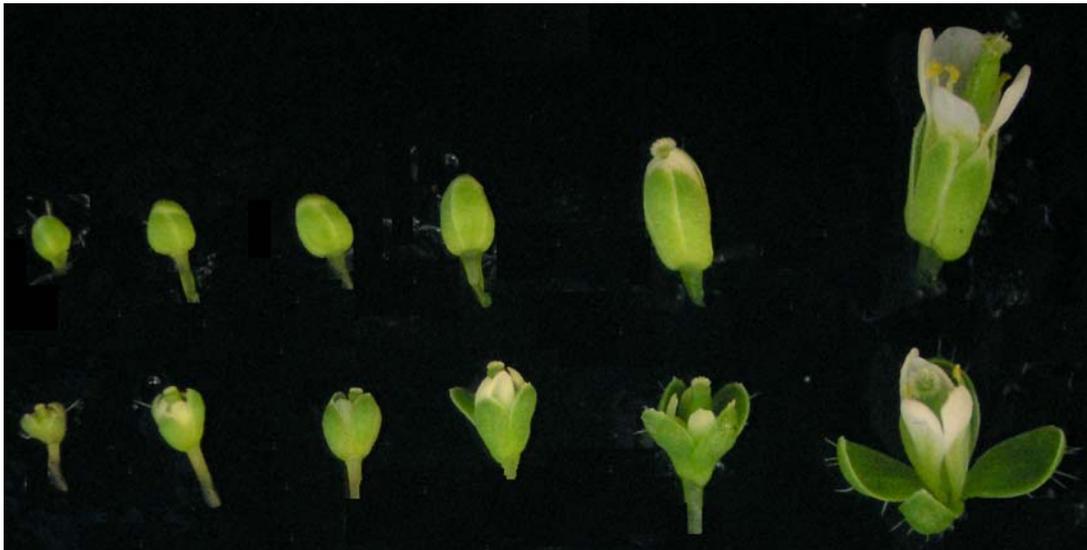


**Figura 14. Fenotipo de las líneas de ganancia de función de *AGL19* en fotoperiodo de días largos.** De izquierda a derecha son las líneas: *35S::AGL19.1*, *35S::AGL19.2* y *35S::AGL19.3*.

La línea de sobre-expresión de *AGL19* (*35S::AGL19.2*) mostró un fenotipo aberrante en todo el proceso de desarrollo de la flor (figura 15 y 16), los sépalos de los botones florales tienen tricomas compuestos en la superficie abaxial, mientras que el tipo silvestre sólo presenta tricomas simples. También se observa que los botones florales abren desde etapas tempranas, esto puede ser debido en gran medida a que el carpelo se desarrolla y crece más en comparación con los demás órganos (figura 16). En todas las etapas de desarrollo los botones florales de la línea de ganancia de función de *AGL19* tienen una talla mayor que el tipo silvestre (figura 16), finalmente la flor alcanza un tamaño claramente superior (figura 17).



**Figura 15. Comparación de botones florales.** Fotos tomadas con Microscopía Electrónica de Barrido a la misma escala. Izquierda *wt*, derecha *35S::AGL19.2*



**Figura 16. Comparación del desarrollo de la flor.** Arriba *wt* y abajo *35S::AGL19.2*.

Los sépalos de la línea de sobre-expresión tienen a diferencia del tipo silvestre tricomas compuestos tanto en la superficie adaxial como en la abaxial (figura 17 y 18). Este último sólo presenta tricomas simples en la superficie abaxial del sépalo.



Figura 17. Comparación de los fenotipos florales. Izquierda wt, derecha 35S::AGL19.2

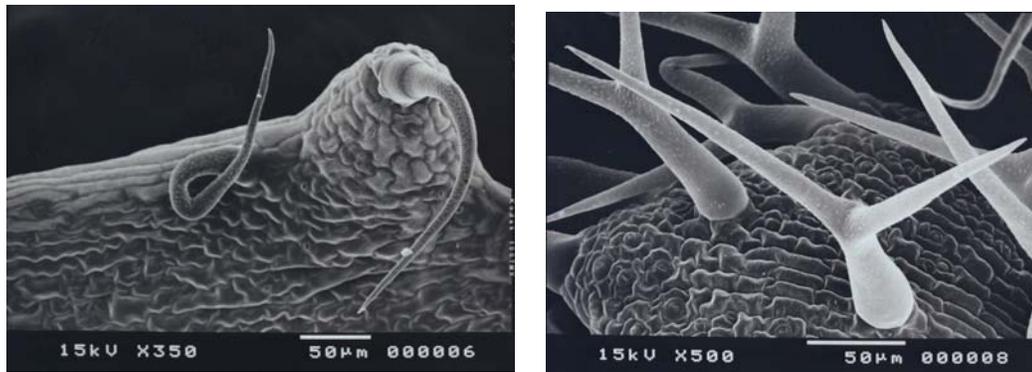
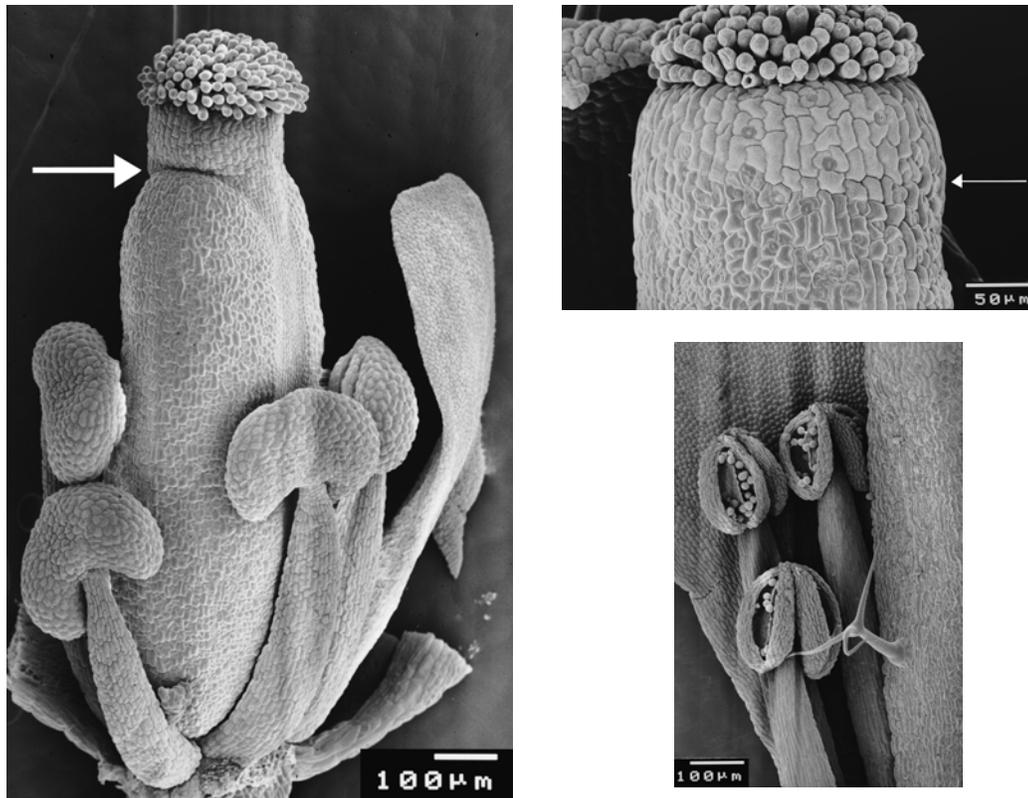


Figura 18. Comparación de superficies abaxiales en sépalos 35S::AGL19.2 (derecha) y wt (izquierda).

Estos resultados sugieren que el gen MADS-box *AGL19* es un importante regulador de la identidad celular, esto debido a que la identidad de las células del sépalo obedecen más a células de hoja.

La línea de sobre-expresión de *AGL19* también presenta malformaciones en los carpelos y el estigma. Se observó que estas plantas presentan uno o más tricomas compuestos sobre el carpelo, además el arreglo de las células del estigma no es

diferenciado, no se ve separada la zona de los carpelos con la del estigma lo cual no sucede en una planta de tipo silvestre (figura 19).



**Figura 19. Comparación de los carpelos de 35S::AGL19.2 y wt.** Izquierda flor wt disectada, derecha línea 35S::AGL19.2, la imagen superior muestra el estigma y la inferior un tricoma compuesto en el carpelo. Las flechas blancas indican la zona donde terminan los carpelos e inicia el estigma.

Las líneas de ganancia de función de *AGL19* tienen una clara alteración en el desarrollo de la flor. Uno de los aspectos más notables de esta alteración es la reversión parcial del meristemo floral al meristemo de inflorescencia.

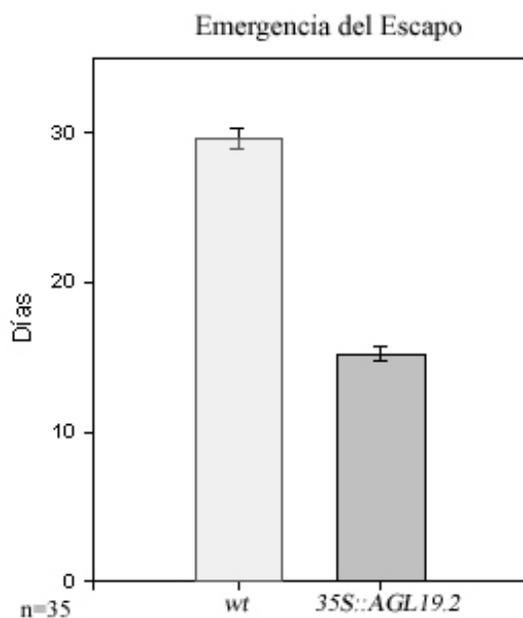
Los fenotipos de flor de líneas de sobre-expresión de *AGL19* analizados en fotoperiodo de día corto y largo tienen una gran semejanza a las plantas de ganancia de función de *AGL24* y a las de pérdida de función de *AP1* (figura 20 y 7f).



**Figura 20. Comparación de flores 35S::AGL19.2 y la mutante de AP1.** La figura superior izquierda es la línea de pérdida de función de AP1 (modificada de Ferrario *et al.*, 2004), Microscopía electrónica de barrido de la línea de ganancia de función de AGL19.

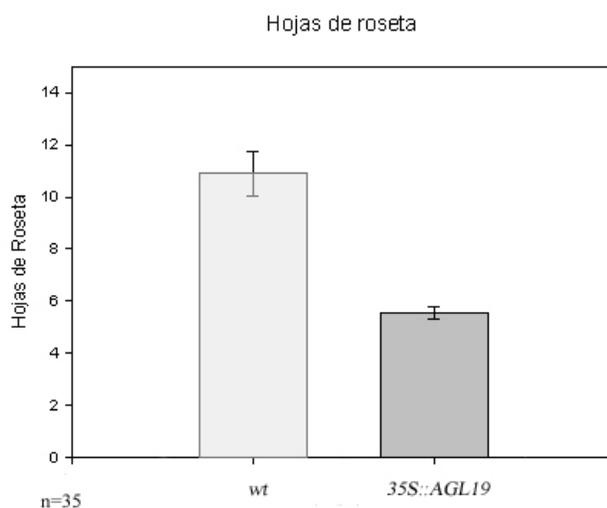
### 5.2.2 Análisis de la transición a la floración.

La línea de sobre-expresión de AGL19 mantiene al igual que en fotoperiodo de día corto una aceleración significativa del tiempo de floración. Los resultados indican que esta línea florece 15 días antes que la planta silvestres (figura 21).

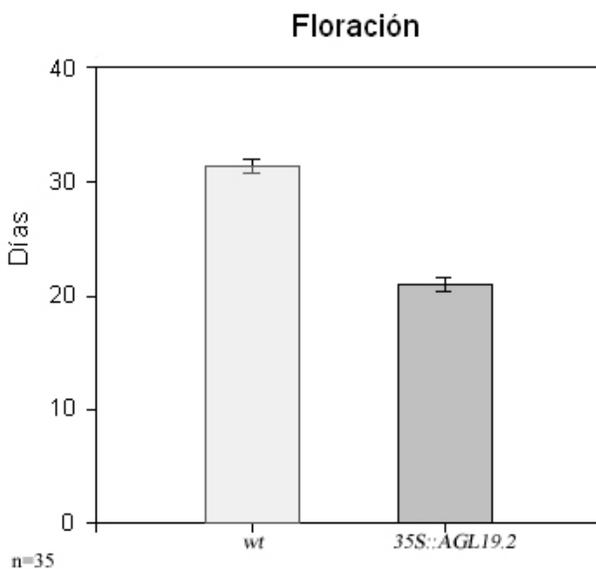


**Figura 21. Tiempo de emergencia del escapo de la inflorescencia en plantas de la línea de sobre-expresión 35S::AGL19.2 y wt . Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.**

Los fenotipos de número de hojas de roseta (figura 22) y tiempo a la producción de la primera flor (figura 23) coinciden con el fenotipo de tiempo de producción del escapo. En todos los casos, la línea de sobre-expresión de *AGL19.2* adelanta la transición a la floración con respecto a *wt* y acorta la fase vegetativa (floración temprana).



**Figura 22.** Comparación del número de hojas de roseta entre la línea de sobre-expresión *35S::AGL19.2* y *wt* al momento de emergencia del escapo. Se registró el día en el que el tallo floral tenía 1 cm de longitud. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.



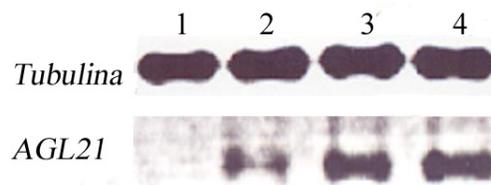
**Figura 23.** Comparación del tiempo de floración de la línea de sobre-expresión *35S::AGL19* y *wt*. Se registró el día en el que abrió el primer botón floral de las plantas. Las barras sobre cada promedio representan un límite de confianza del 95%.

Estos resultados indican que el gen *AGL19* está involucrado en determinar el tiempo de floración.

### 5.3 Interacción de *AGL19* con otros genes.

#### 5.3.1 Interacción de *AGL21* en plantas *35S::AGL19*.

Debido a que se sabe que la proteína del gen *AGL19* interactúa con la proteína del gen *AGL21* (de Folter *et al.*, 2005), se analizó la expresión de este gen en las tres líneas de ganancia de función. Por experimentos anteriores se sabe que no existe expresión de *AGL21* en la parte aérea a los 16 días de edad, por lo tanto se realizó un RT-PCR en esta condición y se encontró que *AGL21* se expresa de manera ectópica en plantas *35S::AGL19* (figura 24).

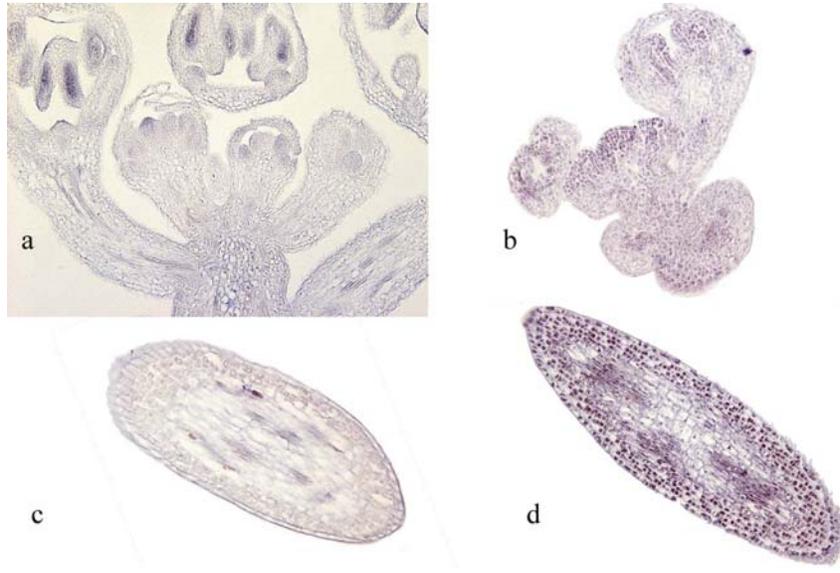


**Figura 24.** RT-PCR de *AGL21* en la parte aérea de plantas *35S::AGL19*. Carril 1 control (*wt*), carril 2 muestra de *35S::AGL19.1*, carril 3 muestra de *35S::AGL19.2* y carril 4 muestra de *35S::AGL19.3*.

#### 5.3.2 Hibridación *in situ* de *AGL21* en plantas *35S::AGL19*

En la hibridación tipo *in situ* se observó que las muestras de las líneas de sobre-expresión de *AGL19* mantenían una expresión ectópica del gen de *AGL21* (figura 25).

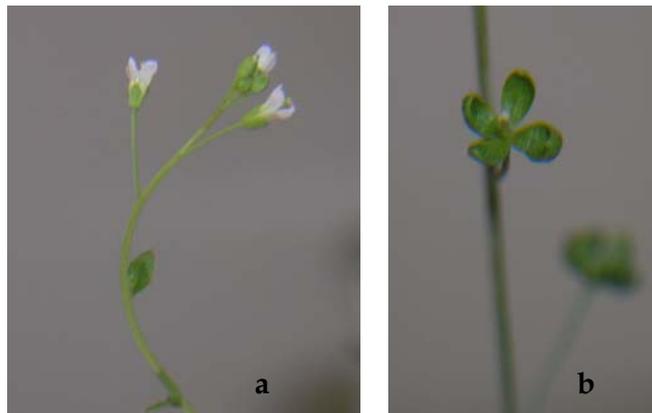
La expresión de *AGL21* se ve alterada en plantas con sobre-expresión de *AGL19*. A diferencia de estos datos en un análisis reciente por experimentos tipo Northern blot (Trabajo realizado con Garay-Arroyo, datos no mostrados) no se observó expresión ectópica de *AGL21*, estos hechos indican que *AGL19* está regulando a *AGL21*.



**Figura 25. Hibridación *in situ* de AGL21 en la plantas 35S::AGL19.** (Trabajo realizado con Perez-Ruiz) a) corte del meristemo en plantas de tipo silvestre, b) corte del meristemo en la línea 35S::AGL19.2 c) corte transversal del tallo del tipo silvestre, d) corte transversal del tallo de la línea 35S::AGL19.2

### 5.3.3 Cruza de las líneas de sobre-expresión de AGL19 y AP1

Las generación T1 (plantas heterocigotos) de esta cruza recupera de manera significativa el fenotipo silvestre (figura 26a).



**Figura 26. Generación T1 de la cruza 35S::AGL19.2 y 35S::AP1.** a) parte apical del tallo principal y b) parte basal del tallo principal.

Estas plantas se crecieron en fotoperiodo de días cortos debido a que es en esta condición donde los fenotipos de las líneas de sobre-expresión de *AGL19* son más drásticos. Por lo tanto la recuperación sería más evidente en este fotoperiodo. Es importante destacar que la recuperación no fue total (figura 24 b), debido a que la generación que observamos es la T1 y en esta sólo presenta una copia de cada transgen , quizás en generaciones mas adelante donde los dos alelos sean homocigotos se logre la recuperación total.

## 6. DISCUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que el gen *AGL19* tiene una función importante en la transición a la floración y en mediar, probablemente en interacción con otros genes, la determinación de tipos celulares en los órganos de la flor. Es posible que este gen también medie la respuesta a señales que activan el crecimiento o que interactúe con genes importantes en regular este aspecto.

La sobre-expresión de *AGL19* en el fotoperiodo de días cortos magnifica el efecto fenotípico de plantas, esto podría deberse a que este gen se encuentra en esta vía de inducción a la floración.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el gen *AGL19* tiene una función importante en la regulación de la transición a la floración. Además, y al igual que el gen *AGL24* que ha sido identificado como un gen de floración, la expresión constitutiva de *AGL19* altera el tiempo de floración y causa una reversión del meristemo floral a meristemo de inflorescencia, sugiriendo que estos dos genes MADS-box pueden ser redundantes. La reversión que se da en los meristemas causa efectos característicos (los cuales fueron descritos durante el análisis fenotípico), ya que el meristemo pasa de determinado a indeterminado nuevamente. Este hecho sugiere el involucramiento de un gen de identidad meristemática floral.

Se sabe que *API* es un gen que promueve el desarrollo floral y lo hace no solo regulando de manera positiva algunos genes que activan el desarrollo de la floración, sino que también por medio de la represión. El observar que el fenotipo de ganancia de función de *AGL19* y el de pérdida de función de *API* son similares sugiere que al igual que *AGL24*, *AGL19* esta siendo regulado negativamente por *API*. Esta primera hipótesis fue corroborada en la cruce de ganancia de función de *AGL19* x *API*, donde se recuperó el fenotipo silvestre.

En ensayos de doble híbrido se ha observado que *AGL19* solamente interactúa a nivel proteico con *AGL21* y *SOC1*, mientras que *AGL21* lo hace con los genes: *AGL19*, *AGL24*, *API*, *SOC1*, *SHP1*, *SHP2*, *STK*, *AG*, *FUL*, *SEP1*, *SEP2*, *AGL6*, *AGL13*, *AGL42*, *AGL17*, *ANR1*, *AGL16*, *AGL15* y *SVP*. Se sabe que los genes MADS forman tetrameros con dímeros o heterodímeros (Jack 2004) por lo tanto es sencillo imaginar que *AGL19* puede interactuar a nivel proteico (*in vivo*) con *AGL21*, *AGL24* y *SOC1*, mediante la acción de *AGL21* el cual podría ser un factor medular en estas relaciones al interactuar con una gran gama de proteínas. Parte de esta evidencia son los estudios realizados de RT-PCR, hibridación tipo Northern blot e hibridación *in situ*, los cuales revelan que *AGL19* regula a *AGL21* durante el desarrollo de *Arabidopsis*.

## 7. CONCLUSIONES

1. La expresión constitutiva del gen MADS-box *AGL19* altera el tiempo de floración y causa una reversión del meristemo floral a meristemo de inflorescencia.
2. Debido a que la línea de sobre-expresión de *AGL19* da un fenotipo muy similar a *35S::AGL24* puede haber una redundancia funcional.
3. El gen *AGL19* es un gen blanco de la represión transcripcional de *API*.
4. *AGL19* regula a *AGL21*.

## 8. REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla, R. E., Pelaz, S., Liljegen, J. S., Gold, E. G., Burgeff, C., Ditta, S. C., Ribas, L., Martínez-Castilla, L., Yanofsky, F. M. (2000a) An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 97 :5328 - 533
- Alvarez-Buylla, R. E., Liljegen, J. S., Pelaz, S., Gold, E. G., Burgeff, C., Ditta, S. C., Ribas, L., Vergara-Silva, F., Yanofsky, F. M. (2000b) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. Plant Journal. Vol. 24: 457-466
- Amasino M.R. (2005) "Vernalization and flowering time". Current Opinion in Biotechnology. Vol.16:154-158
- Ambrose, B.A., Lerner, D.R., Ciceri, P., Padilla, C. M., Yanofsky, M. F., y Schmidt, R. J. (2000) Molecular and genetic analies of the *Silky 1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots. Mol.Cell. Vol.5: 569-579
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature. Vol 408: 796:815
- Boss P. K, Bastow M. R, Mylne J. S y Dean C. "Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, Promoting, and Resetting" The plant cell. Vol.16:S18-S31
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Alvarez, J., Wigel, D., Meyerowitz, E.M y Smyth, D.R. (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. Development. Vol. 119:721-743
- Bowman, J. (1994) *Arabidopsis* an atlas of morphology and development. Edit. Springer-Verlag. Impreso en New York
- Burgeff D. C., (2001), Tesis de doctorado - Genes MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*: Patrones de expresión insitu y análisis filogenético

- Burgeff, D. C., Liljegren S. J., Tapia, L. R., Yanofsky, M.F., Alvarez-Buylla, E. R. (2001) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*. Vol. 214: 365-272
- Coen, E.S., Meyerowitz, E. M. (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*. Vol. 353 :31-37
- Davies PJ, ED. (1995) *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*, 2<sup>nd</sup> ed. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Davidson, E.H., Rast, J.P., Oliveri, P., Ransick, A., Calestani, C., Yuh, C., Minokawa, C., Amore, G., Hinman, V., Arenas-Mena, C., Otim, O., Brown, C.T., Livi, C.B., Lee, P. Y., Revilla, R., Rust, A.G., Pan, A., Schilstra, M.J., Clarke, P. J. C., Arnone, M. I., Rowen, L., Cameron, R. A., Mc Clay, D. R., Hood, L., Bolouri, H. (2002) A genomic regulatory network for development. *Science*. Vol. 295:1669-1678
- Di Laurenzio, L., Wisocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., Benfey, P.N. (1996) The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*. Vol. 86 : 423-433
- Doebley, J., Lukens, L. (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant cell*. Vol. 10 : 1075-1082
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. Vol. 119 : 71-84.
- Dolan, L., Okada, K. (1999) Signalling in cell type specification. *Sem. Cell& Dev.Biol.* Vol.10 : 149-156
- Ferrario S., Busscher J., Franken J., Gerats T., Vandenvussche M., Angenent C. G., Immink G.H. R. (2004) Ectopic expression of the petunia MADS-Box gene *UNSHAVEN* accelerates flowering and confers leaf-like characteristics to floral organs in a Dominant-Negative manner. *Plant cell*. Vol. 1-16

- De Folter, S., Immink, R.G.H., Kieffer, M. et al (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS box transcription factors. *Plant Cell*. Vol. 17 : 1424-1433
- Fu X y Harberd NP (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* Vol 421: 740-743.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F., Martienssen, R. (1998) The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*. Vol. 125: 1509-1517 Amasino M.R. (2005) "Vernalization and flowering time". *Current Opinion in Biotechnology*. Vol.16:154-158
- Halliday, K.J., Salter, M.G., Whitelam, G.C (1994). "Phytochrome B and at least one other phytochrome mediate the accelerated flowering response of *Arabidopsis thaliana* L. to low red/far-red ratio. *Plant Physiol*. Vol.104:1311-1315
- Halliday, K.j., Salter, M.G., Thingnaes, E., and Whitelam, G.C. (2003). "Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT". *Plant J*. Vol.33:875-885
- Hamann, T., Mayer, U., Jürgens, G. (1999) The auxin-insensitive *bodenlos* mutation affects primary roots formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development*. Vol. 126: 1387-1395.
- Jack, T. (2001) Plant development going MADS. *Plant Mol. Biol*. Vol. 46 : 515-520
- Jack, T. (2001) Relearning our ABC's : new twists on an old model. *TRENDS in a plant science*. Vol.6: 310-316
- Komeda Y (2004). "Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*" *Annu.Rev.Plant Biol*. Vol.55: 521-535
- Lee, H, Suh, S.S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.A., Kim, S.G., Lee, J.S., Kwon, Y.M., y Lee, I. (2000) The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes and Dev*. Vol. 14: 2366-2376

- Leiser, O., y Day, S. (2003) Mechanisms in plant development. Editorial Blackwell
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., Yanofsky, M.F. (2000) *SHATTERPROOF* MADS-box gene control seed dispersal in *Arabidopsis*. Nature. Vol. 404 : 766-770.
- Martinez-Castilla, L., Alvarez-Buylla, R. E. (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. Proc Natl Acad Sci. Vol. 100 : 13407-13412
- Mendoza L, Alvarez-Buylla R.E. (1998) Dynamics of the genetic regulatory network for *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. Journal of Theoretical Biology. Vol. 193 : 307-319
- Mendoza L, Thieffry D y Alvarez-Buylla R.E. (1999) Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical análisis. Bioinformatics Vol.15: 593-606
- Messenguy F y Dubois E (2003) Role of MADS-box genes and their cofactors in combinatorial role of gene expression and cell development. Gene, Vol.316: 1-21
- Meyerowitz, E.M. (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. Cell. Vol. 56 : 263-269
- Meyerowitz, E.M. (1994) Structure and organization of the *Arabidopsis thaliana* nuclear genome. 21-36. En: Meyerowitz, E.M. y Somerville, D.R. (eds.). *Arabidopsis*. Cold spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, E.U.A.
- Meyerowitz, E.M. (1997). Plants and the logic of development. Genetics Vol. 145 : 5-9
- Michaels D. S, Amasino M. R. (1999) "FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering" The Plant Cell. Vol.11:949-956
- Michaels S, Himelblau E, Kim Y. S, Schomburg M. F, Amasino R. (2005) " Integration of Flowering Signals in Winter-Annual *Arabidopsis*" Plant Physiology. Vol.137:149-156

- Mockel T, Yu X, Shalitin D, Parikh D, Michael P, Liou J, Huang J, Smit Z, Alonso J.M, Ecker R, Chory J y Lin C (2004). "Regulation of flowering time in *Arabidopsis* by K homology domain proteins" PNAS. Vol. 101: 12759-12764
- Moon J, Lee H, Kim M, Lee I. (2005) "Analysis of Flowering Pathway Integrators in *Arabidopsis*" Plant Cell Physiol. Vol.46:292-299
- Ng M., Yanofsky M.F. (2001). Function and evolution of the plant MADS-box gene family. Nature Rev.Gen. Vol. 2 : 186-195.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F. (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. Nature. Vol. 405:200-203.
- Putterill J, Laurie R, Macknight R. (2004) "It's time to flower: the genetic control of flowering time" BioEssays. Vol.26:363-373
- Riechmann, J.L., Meyerowitz, E. M. (1997). MADS domain proteins in plant development. Biol. Chem. Vol. 378 : 1079-1101
- Rounsley, S.D, Ditta G.S. y Yanofsky MF (1995) Diverse roles for MADS-box genes in *Arabidopsis* development. Plant cell. Vol 7: 1259-1269
- Samach, A., Onouchi, H, Gold, SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF y Coupland G (2000). Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. Science. Vol. 288 : 1613-1616
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen V, Terlow M, Lawson E, Dean D, Weisbeek P. (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and meristem initials. Development. Vol. 120 : 2475-2487.
- Scheres, B., McKhann, H., Van den Berg, C., Willemsen, V., Wolkenfelt, H., de Vrieze, G y Weisbeek, P. (1996) Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Soil. Vol. 187: 97-105.

- Scheres, B. y Wolkenfelt, H. (1998) The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol. Biochem.* Vol.36: 21-32
- Scheres, B., Benfey, N. P. (1999) Asymmetric cell division in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 50 : 505-537
- Simpson, G. G., Gendall A.R., Dean, C. (1999) When to switch to flowering. *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* Vol. 15: 519-550
- Smyth, D. (2000) A reverse trend-MADS function revealed. *Trends Plant Sci.* Vol. 5 : 315-317.
- Srivastava L.M. (2002) *Plant growth and development: hormones and environment.* Academic Press. 772pp
- Sung, Z.R y Amasino, R.M.(2004). "Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature.* Vol.427:159-164
- Theissen, G., Saedler, H. (1995). MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's biogenetic law revisited. *Journal Curr. Opin. Genet. Dev.* Vol. 5:628-639
- Van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B. (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature.* Vol. 378: 62-65
- Van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., Scheres, B. (1997) Short range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature.* Vol 390: 287-289.
- Vergara-Silva, F., Martínez-Castilla, L., Alvarez-Buylla, R.E. (2000) MADS-box genes: development and evolution of plant body plans. *Journal of Phycology.* Vol.36: 803-812.
- Vergara-Silva, F. y Alvarez-Buylla, E.R. (2001) Descubrimiento de los genes homeóticos en la era molecular y la construcción de una biología evolutiva del desarrollo. 84-113. En: Rudomin, P. y Blazquez-Graf, N (coord.). *Ciencias de la vida.* 1era ed. Siglo XXI editores, México.
- Wilson, Z.A. (2000). *Arabidopsis a practical approach.* Oxford university press.

- Winter, K. Becker, A., Munster, T., Kim, J.T., Saedler, H., Theissen, T.(1999) MADS-box genes reveal that Gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. Proc. Nat. Acad. Sci. Vol. 96:7342-7347
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. (1998) Principles of development. Current Biology LTD. Oxford University Press, 484p.
- Yanofsky, M.F., Meyerowitz E.M., (1991) AGL1-AGL6, An *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. Genes Dev. Vol.5 (3) : 484-95
- Yu H, Xu Y, Ling E, Kumar P. (2002) "AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals" PNAS. Vol.99:16336-16341
- Yu H, Ito T, Wellmer F, Meyerowitz E. (2004) "Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development". Nature Genetics. Vol. 36:157-161
- Zhang, H., Forde, B.G. (1998) An *Arabidopsis* MADS-Box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. Science. Vol. 279 : 407-409
- Zhang, H., Forde, B.G. (2000) Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. J. Exp. Bot. Vol.51 : 342 51-59

## ANEXO

### Oligonucleótidos utilizados:

TABLA 1

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia
<i>AGL21</i>	OEAB163	GTCGGTTATTGATAGATACAACAAGAGC
<i>AGL21</i>	OEAB167	ACTCCACCAAGAGCAAACG
<i>AGL21</i>	OINSITU21F	TGGCAAACACAAACGG
Ubiquitina	Ubi F	TTGCTGACTACAATATCCAGAAGG
Ubiquitina	Ubi R	CTTCTTAAGCATAACAGAGACGAG
AP1	AP1F	GTTCAATTGAAGAG
AP1	AP1R	ACCTGAGTCCGACGTC AAT

### Esterilización y vernalización de semillas.

1. Se colocan las semillas en un tubo eppendorf.
2. Se les agrega un mililitro de EtOH al 75% y se agitan con vortex por 5 minutos.
3. Se retira el EtOH y se agrega 1ml una solución de cloro al 5% y SDS al 1% (Dodecil Sulfato de Sodio).
4. Se dejan agitando por 15 minutos.
5. Se retira la solución en la campana de flujo laminar y se les agrega 1ml de agua bidestilada.

6. El agua se retira y se les agrega nuevamente agua hasta que ya no aparezca espuma al agitar los tubos.
7. Una vez enjuagadas las semillas se colocan a 4°C por 2 días.

### **Síntesis de ADNc con la enzima Reverso Transcriptasa (superscript) para RT-PCR.**

1. En un tubo eppendorf agregar lo siguiente :
  - 1µl de oligo adaptador (500µg/ml)
  - 1µl de una mezcla de dNTP`s (10Mm de cada uno, dATP, dGTP, dCTP y dTTP a un pH neutral)
  - 12 µl de agua destilada, en donde previamente ya se disolvió el ARN.
2. Calentar la mezcla a 65°C por 5 minutos y colocar inmediatamente en hielo, dar un spin y agregar lo siguiente:
  - 4µl de Buffer de la primera cadena (Firs-strand buffer)
  - 2µl de DTT 0.1 M (ditriotreitol).
3. Se mezclan suavemente y después se incuban a 37°C por 2 minutos.
4. Se añade 1µl (200 unidades) de Superscript y se mezcla bien por piepeteo.
5. Incubar a 37°C por 50 minutos y después a 70°C por 15 minutos
6. Colocar inmediatamente en hielo y añadir 1µl de E.coli Rnase H.
7. Incubar por 20 minutos a 37°C.

### **Extracción de ARN total con Tri Reagent (Trizol)**

1. Colocar cada muestra (100mg de tejido) en un tubo eppendorf estéril y congelar con nitrógeno líquido.
2. Moler la muestra (con palitos de plástico o varillas de vidrios) hasta que se forme un polvo fino homogéneo.
3. Agregar 1 ml de trizol a cada muestra y homogenizar con la pipeta
4. Mantener las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos
5. Agregar 0.2ml de cloroformo y agitar por 15 segundos.
6. Centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C.
7. Retirar la fase acuosa (superior) y transferirla a un nuevo tubo esteril.
8. Agregar 1.5ml de isopropanol.
9. Mantener las muestras a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos.
10. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C.
11. Remover el sobrenadante y lavar la pastilla (ARN precipitado) con 1 ml de EtOH al 75%.
12. Agitar con vortex y después centrifugar 5 minutos a 10,000 a 4°C.
13. Eliminar el EtOH y dejar que seque la pastilla de ARN por aproximadamente 5 minutos.

Resuspender la pastilla en 20 µl de agua bidestilada.

### **Fijación en FAA y deshidratación.**

1. Hacer la mezcla de fijación (EtOH 50%, Acido acetico 5%, Formaldehido 3.7%, Agua 41.3%).
2. Añadir de 10-15 ml de esta mezcla de fijación en un vial de 20 ml.
3. Cortar las muestras que se van a fijar e inmediatamente colocarlas en los viales (se ponen alrededor de 30 piezas de tejido por vial).
4. Colocar el vial en una bomba de vacio por 15 minutos.
5. Quitar el vacio suavemente y repetir el paso 4.
6. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas.
7. Repetir el paso 4.
8. Quitar el vacio e incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
9. Remover la mezcla de fijación y añadir alcohol al 50%.
10. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos y añadir alcohol al 50%.

### **DESHIDRATACIÓN**

11. Remover el alcohol al 50% y remplazar con alcohol al 60%.
12. Incubar de 20-30 minutos.
13. Remover el alcohol al 60% y añadir alcohol al 70%.
14. En el paso anterior se puede almacenar a 4°C.
15. Repetir los cambios de alcohol hasta llegar a alcohol al 100%.