



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Papel funcional de dos genes MADS-box tipo *SOC1*,
(*AGL19* y *AGL14*) en las vías de regulación de la
transición a la floración

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MITZI VILLAJUANA BONEQUI

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES

MÉXICO,D.F.

DICIEMBRE, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR, DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE PLANTAS DEL INSTITUTO DE ECOLOGÍA DE LA UNAM, BAJO LA SUPERVISIÓN DE LA DRA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP) Y EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT).

AGRADEZCO A LOS H. MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL POR SU ASESORIA Y VALIOSOS COMENTARIOS:

DRA. GLADYSS ILEANA CASSAB LÓPEZ

DRA. ALICIA GAMBOA DE BUEN

DRA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES

DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

DR. FELIPE CRUZ GARCÍA

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES POR TODO EL APOYO, CONFIANZA Y ASESORÍA BRINDADOS INCONDICIONALMENTE DURANTE MI FORMACIÓN.

AL MTRO. RIGOBERTO VICENCIO PÉREZ RUÍZ POR LA REALIZACIÓN DE LAS HIBRIDACIONES *IN SITU*, PARTE IMPORTANTE DE ESTE TRABAJO.

A LA DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN POR EL ASESORAMIENTO ACADÉMICO Y TÉCNICO BRINDADO DURANTE LA REALIZACIÓN DE ÉSTE PROYECTO.

A LA DRA. ADRIANA GARAY ARROYO POR EL APOYO E INTERÉS MOSTRADO HACIA ESTE TRABAJO.

A TODOS LOS MIEMBROS DEL LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR, DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE PLANTAS POR COMPARTIR MUCHOS MOMENTOS GRATOS, POR LA POLÉMICA DURANTE LOS SEMINARIOS Y POR SU DISPOSICIÓN A ESCUCHAR Y AYUDARME A RESOLVER DUDAS.

A MI AMADA FAMILIA CUYO APOYO INCONDICIONAL ES LA BASE DE ESTE LOGRO ACADÉMICO.

Agradecimientos (las segundas partes también son buenas),

A la Dra. Elena Álvarez, por el enorme apoyo y amistad brindados en momentos importantes, por comprender mi lado humano, aceptarlo y ayudarme a mejorar.

A las Dra. Alicia Gamboa y la Dra. Rocío Cruz por su asesoría incondicional, por escucharme, por sus pláticas y sus comentarios, para mi siempre muy valiosos.

Al Dr. Felipe Cruz por el interés mostrado a lo largo del desarrollo de mi proyecto, su asesoría y las charlas informales.

A Berenice y Rosalinda por los ánimos que me echaban cuando no todo salía bien, por las tardes casi noches en el laboratorio, por los encuentros en horarios impensables (domingo), por las comidas, por reír juntas y por hacer que pueda cambiar de perspectiva lo que parece un inminente fracaso sin remedio. Por el apoyo en lo académico y emocional. A Bere, por la revisión y correcciones exhaustivas hechas a esta tesis, mil gracias.

A la Dra. Adriana Garay por su energía, su alegría y sus efectivas dosis de buena música. Por combatir mis momentos de pesimismo, a veces crónico.

A Dn. Rigo por enseñarme el maravilloso mundo de las hibridaciones *in situ* y otras técnicas de laboratorio y de la vida, por sus consejos, por escuchar mis locuras, todo sin decirme abiertamente: esta Ud. Loca. A Yolanda por escucharme sin morir en el intento, sus comentarios y buenos consejos.

A Marcelina (la chiquita...), por ser un ejemplo de que existen personas más irónicas que yo en el mundo. Por su disciplina y excelente ejemplo de trabajo en el laboratorio.

A la chaviza del labo...a Gabriel por sus pláticas, su apoyo moral y por ayudarme a enfrentar mis miedos e impulsar a hacerme algo cuyos resultados me han hecho muy feliz. A Esther Zúñiga por su amistad durante toda nuestra formación, por rescatarme del despiste y por siempre tener tiempo para una rizada juntas. A Anidia por haber estado siempre en el momento justo que no podía más con los trámites burocráticos. A Alma y Mariana por sus pacientes respuestas a mis preguntas absurdas o... ¿fuera de contexto?. A Alma de los Ríos y a Hiram (el chiquito de Anidia) por compartir conmigo varios momentos cotidianos muy gratos y el viaje a Chiapas. A Carlos y a Eduardo, los chicos (guapos) del laboratorio. A Arturo. A Enrique.

De manera muy especial quiero agradecer a mis Padres, quienes son muestra de amor, firmeza, honestidad y lealtad. A mi madre, María de la Luz Bonequi Palomares, ejemplo de responsabilidad, constancia y compromiso. A mi padre, Fred Villajuana Caldiño, por templar

mi carácter. A mi hermano Sinuhé por ser él, y ser siempre una muestra de amor incondicional. A Sacbé, porque es luz de mi vida y desesperación de mi cotidianeidad.

A mi abuelita Emma Palomares y a toda la familia: Toños en sus dos presentaciones (grande y chico), Danielillo, Monchis, Eve, la beba y los niños, Humberto, Rosa, Luis, Diana, Gina, Avis, Pacolín, mi primito Omar, Ericka y anexo (el único sobrino, Abraham, beso), Rucho (con su memoria de elefante), tia Dalia, en fin, a todos por su amor y compañía.

A mi maestra de Griego, Natalia Moreleón, por su enorme amor hacia la enseñanza y por permitirme profundizar en el estudio del Griego Moderno al facilitarme la obtención de una beca. Por transmitirme esa pasión, entrega y gusto por lo que uno realmente ama. Y a todos mis compañeros de clase de Griego Moderno.

A mi maestro de Alemán, Rubén Garciadiego Ramos, por su capacidad de tolerancia a lo absurdo, sus ejemplos inolvidables y su sentido del humor. A Abdiel y Víctor.

A mi pseudo-doble, Úrsula Albo Cos, por su ayuda, comprensión, tolerancia y pláticas políglotas, bueno, a veces sin mucho sentido.

A mi coach de gimnasia, Kalina Dimitrova Doytcheva, por su amor y enseñanza, y por tener siempre las puertas abiertas a mis llegadas cada vez más fortuitas. A Luis Gutierrez y a Bárbara, Ingrid, Patricia y todas mis compañeras de gimnasia.

A mis amigas y madrinas del alma: Cynthia y Vanessa por el apoyo siempre incondicional (aún en lo más loco y cyber), porque aunque pasa el tiempo no pasa nuestra tolerancia y amistad mutua. A las chicas del café, Lysette, Saibie y Poulinne. A Alejandro, Nadine, Fernando, Brandon, Yúmari, Ericka, Juan Carlos "Tanaka", Paola Colín (sobretudo por su risa contagiosa), Marlene, y a toda la banda que el Alzheimer no me deja recordar.

A mis amigos del otro lado del charco, que hicieron de mi viaje una agradable experiencia: Marguerite, Kleida, Mathieu, María Amor, Milagros, Liliane, Valérie, Sevèrine, Verónica y Marselo. Sas agapo polu.

A Asis Hallab por compartirme todo su mundo, su confianza y paciencia. Por mostrarme el el pequeño niño que todos tenemos dentro, la fantasía y la risa sana.

A la familia Hallab por el asilo político y enorme amabilidad. Vielen danke.

A la vida...

"Quisiera dedicar este trabajo a todas las mujeres que aman su género, mujeres que he conocido, mujeres que admiro y respeto: mujeres a las cuales quisiera, algún día, parecerme y compartir su fuerza".

ÍNDICE

1	Introducción	
	1.1 Genes MADS-box	1
	1.2 Transiciones durante el desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
	1.3 Tiempo de floración	3
	1.3.1 Fotoperiodo	6
	1.3.2 Giberelinas	7
	1.4 Interacciones proteicas	7
2	Justificación	8
3	Hipótesis	10
4	Objetivos	
	3.1 General	10
	3.2 Particulares	10
5	Antecedentes	
	4.1 <i>AGL14</i>	11
	4.2 <i>AGL19</i>	13
6	Materiales y métodos	14
7	Resultados	
	6.1 <i>AGL14</i>	17
	6.2 <i>AGL19</i>	30

7	Discusión	
	7.1 <i>AGL14</i>	26
	7.2 <i>AGL19</i>	34
8	Conclusiones	36
9	Perspectivas	37
10	Bibliografía	39
11	Anexos a materiales y métodos	
	11.1 Extracción de RNA	45
	11.2 RT-PCR	45
	11.3 Oligonucleótidos	47
	11.4 Tablas	49

INTRODUCCIÓN

Genes MADS-box

Los genes MADS-box codifican para factores de transcripción que presentan un dominio conservado de aproximadamente 56 aminoácidos. Este dominio se denominó MADS con base en la letra inicial de cada una de las primeras proteínas que se identificaron para esta familia, **MCM1** en *Saccharomyces cerevisiae*, **AGAMOUS** en *Arabidopsis thaliana*, **DEFICIENS** en *Antirrhinum majus* y **Serum Response Factor** en *Homo sapiens* (Shore y Sharrocks, 1995).

La mayoría de los factores de transcripción MADS en plantas reconocen una secuencia consenso en el DNA de sus genes blanco, conocida como caja CArGT (5'-CC(A/T)6 GG-3'). Estas proteínas pueden actuar en combinación con ellas mismas o con otras proteínas MADS para formar complejos en los cuales las proteínas accesorias trabajan como cofactores que redirigen la especificidad regulatoria del complejo (Shore y Sharrocks, 1995; Messenguy y Dubois, 2003).

Estudios filogenéticos demuestran que los genes MADS-box estaban presentes en el ancestro hipotético común de los hongos, animales y plantas. Estos estudios permitieron definir además dos grandes grupos dentro de esta familia: los del tipo I, que presentan una secuencia parecida a las secuencias Serum Response Factor (SRF) en humano; y los del tipo II, que presentan un mayor parecido con las secuencias tipo Myocyte enhancer factor-2 (MEF2) presentes en animales y hongos (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b).

En plantas, las proteínas con dominio MADS del tipo II presentan una organización estructural característica conocida como MIKC (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a). Cada una de estas letras representa un dominio o una región dentro de la proteína. M representa al dominio MADS; I representa una secuencia intermedia no conservada; K representa una de las regiones más conservadas que ha mostrado ser importante para las interacciones proteína-proteína al formar una estructura de hélices anfipáticas. Por último C representa una región carboxilo terminal muy variable que podría funcionar como dominio de trans-activación (Purugganan *et al.*, 1995; Figura 1).

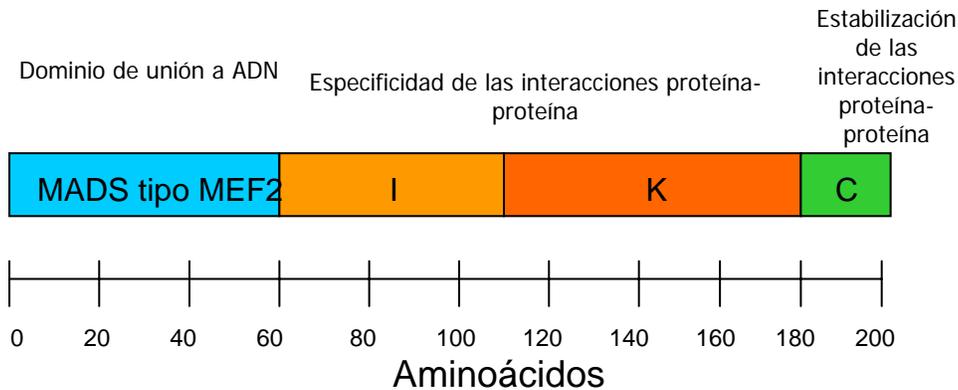


Figura 1. Estructura modular representativa de dominios de las proteínas MADS del tipo MICK en plantas.

La mayoría de las proteínas MADS caracterizadas en angiospermas se encuentran involucradas en procesos que regulan el desarrollo y diferenciación celular. La mayoría de los miembros de un clado comparten en gran medida funciones relacionadas y patrones de expresión similares (Theissen *et al.*, 1996). En *Arabidopsis thaliana*, existen al menos dos clados con expresión ***preponderantemente*** en órganos vegetativos. El primer clado está conformado por los genes *AGL17*, *AGL16*, *AGL21* y *ANRI* (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003), cuyos patrones de expresión específicos han sido descritos (Rounsley *et al.*, 1995; Zhang y Forde, 1998; Burgeff *et al.*, 2002). *ANRI* se encuentra involucrado en el proceso de crecimiento de las raíces laterales en respuesta a concentraciones locales elevadas de nitrato (Zhang y Forde, 1998). El segundo grupo está formado por los genes *AGL14*, *AGL19*, *AGL42*, *AGL71*, *AGL72* y *AGL20/SOC1* (*Supresor of Overexpression of Constans 1*; Figura 3, Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003). De éstos se conoce el patrón de expresión de *AGL14* y *AGL19*, que parecen ser específicos de raíz (Rounsley *et al.*, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a), y de *SOC1*, que además de expresarse en la raíz, se expresa en el meristemo apical, en donde es regulado por señales provenientes de diferentes vías de inducción floral (giberelinas, vernalización y fotoperiodo; Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000).

Transiciones durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

La transición del estado juvenil al adulto, durante el desarrollo vegetativo, se caracteriza por la aparición de determinados caracteres morfológicos en las hojas de roseta como son la aparición de tricomas en la parte abaxial, una reducción de la longitud del pecíolo y un incremento en la longitud de la hoja (Willmann y Poethig, 2005). Otra de las características que definen esta transición de fase es la capacidad que adquieren las plantas para responder a los estímulos que inducen la floración. Una vez inducido este proceso el meristemo vegetativo, que daba lugar únicamente a la formación de hojas, se convierte en un meristemo de inflorescencia (Araki, 2001; Leyser y Day, 2003).

A este proceso de cambio de meristemo vegetativo a meristemo de inflorescencia se le denomina transición floral. Este proceso está regulado por una red jerárquica de proteínas regulatorias que interactúan y responden a las diferentes señales ambientales, como la luz y la temperatura (Corbesier y Coupland, 2006).

La percepción del descenso de la temperatura durante el invierno o vernalización se lleva a cabo principalmente en el meristemo apical del tallo, mientras que los cambios en el fotoperiodo, cantidad y calidad de la luz se llevan a cabo en las hojas (Bernier y Périlleux, 2005) en donde se produce una señal sistémica que desencadena el proceso de floración (Aukerman y Amasino, 1998; Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005).

Tiempo de floración

Las plantas son organismos sésiles que deben responder a las condiciones ambientales que se les presenten. Esto ha provocado que evolucionen como organismos con una gran plasticidad genética y morfológica (Bernier *et al.*, 1993; Ausin *et al.*, 2005).

Se reconocen al menos tres teorías principales en cuanto a la respuesta bioquímica del proceso de floración. 1) El concepto de “florigeno / antiflorígeno”, en el cual Chailakhyan en 1937 propone la existencia de una hormona (universal, simple y específica) encargada de promover la floración; hasta ahora ninguna hormona con esas características ha sido aislada en ninguna planta (Aukerman y Amasino, 1998). 2) La teoría de la “desviación de nutrientes” que proponen Sachs y Hackett en 1983, considera que el incremento en la abundancia de recursos y su percepción en el ápice de la planta da lugar a la floración. 3) La hipótesis del “control multifactorial” en la cual Bernier y colaboradores en 1981 proponen que la transición

floral está controlada por muchos factores químicos, como podrían ser las fitohormonas y otras sustancias (en Bernier *et al.*, 1993).

Genéticamente, se definen cuatro vías de regulación de la floración: una dependiente de la duración del día o fotoperiodo; una dependiente de las bajas temperaturas o de vernalización; una independiente del fotoperiodo denominada autónoma; y una dependiente de la giberelinas, hormonas que promueven la floración y cuyo efecto es más notorio durante fotoperiodos cortos, es decir, aquellos fotoperiodos cuya proporción de horas de luz es menor con respecto al de horas de oscuridad (Figura 2; Mouradov *et al.*, 2002; Simpson y Dean, 2002; Boss *et al.*, 2004; Putterill *et al.*, 2004).

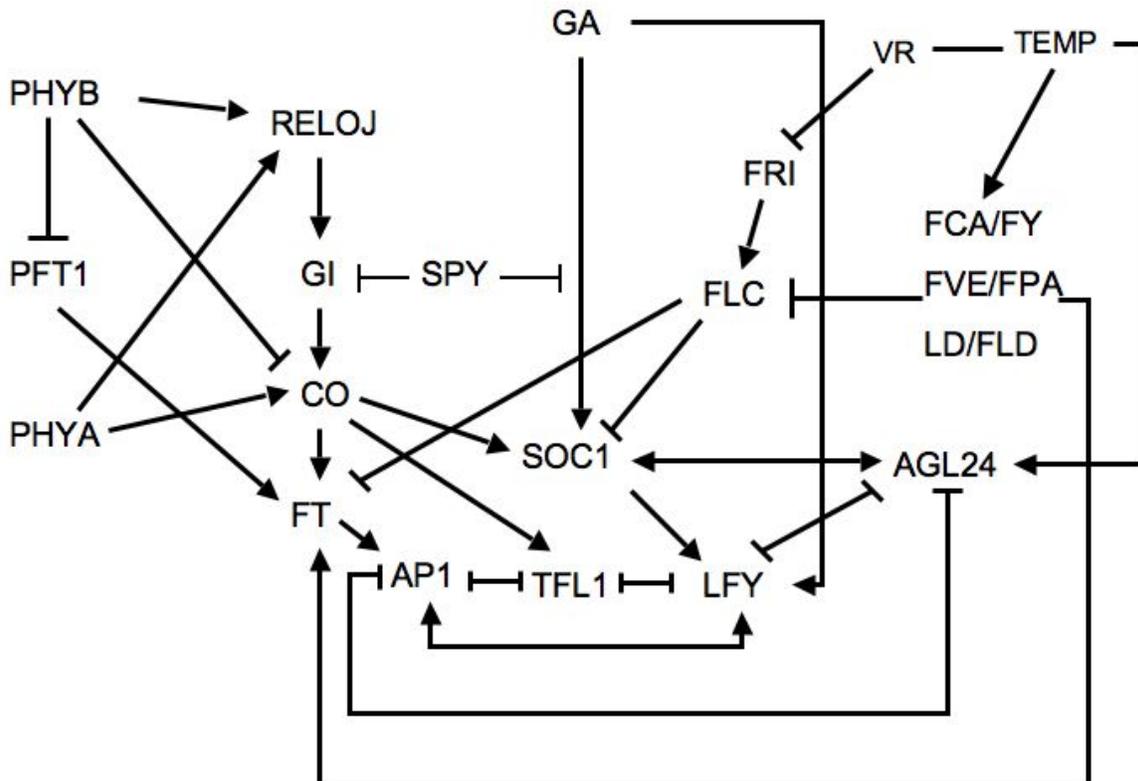


Figura 2. Esquema general de las vías de inducción floral y sus blancos moleculares en *Arabidopsis*. Las flechas representan efectos de promoción mientras que las barras T representan efectos de represión. TEMP: temperatura. VR: Vernalización. Simplificación basada en las vías reportadas por Mouradov *et al.*, 2002, Simpson y Dean, 2002; Boss *et al.*, 2004; Putterill *et al.*, 2004; y Bernier y Périlleux, 2005.

Dentro la compleja red de regulación de la transición floral se reconocen, de manera general, tres tipos de genes dependiendo de la influencia que ejercen en este proceso:

- Genes represores de la floración. Son genes encargados de reprimir la transición floral por medio de la inhibición de la activación de los integradores de las vías de inducción de la floración. Ejemplos: *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*, un gen tipo MADS-box; Michaels y Amasino, 1999; Hepworth *et al.*, 2002) y sus activadores; así como *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*, codifica para una proteína que es similar a la inhibidora de la Raf cinasa en animales y presenta una alta similitud en secuencia con FT; Alvarez *et al.*, 1991; Shannon y Meeks-Wagner, 1991 y 1993; Ohshima *et al.*, 1997) y *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*, codifica para una proteína con dominio MADS; Hartman *et al.*, 2000).
- Genes integradores. Genes en los que convergen diversas señales provenientes de las vías de inducción de la floración y que por tanto resultan ser claves, ya que regulan la expresión de los genes de la identidad del meristemo floral (Kardailsky *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2005). Ejemplos: *FLOWERING LOCUS T* (*FT*, codifica para una proteína que es similar a la inhibidora de la Raf cinasa en animales; Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS* (*SOC1*, un gen MADS-box; Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000) y *LEAFY* (*LFY*, codifica para un factor de transcripción; Weigel *et al.*, 1992). Por otro lado *AGAMOUS LIKE 24* (*AGL24*, un gen MADS-box), promotor del destino de inflorescencia, participa en una vía de señalización cruzada permitiendo la comunicación entre los genes integradores (Yu *et al.*, 2004).
- Genes de identidad del meristemo floral (**FMI**, por sus siglas en inglés Floral Meristem Identify genes). Son genes encargados de promover el establecimiento y la diferenciación de grupos celulares para la morfogénesis de los órganos florales. Ejemplos: *APETALA 1* (*API*, un gen tipo MADS-box; Irish y Sussex, 1990) y *AGAMOUS* (*AG*, un gen tipo MADS-box; Bowman *et al.*, 1989, 1991a, 1991b).

Fotoperiodo

La luz juega un papel decisivo en el proceso de inducción de la floración en las plantas. *Arabidopsis thaliana* es una planta que florece más rápidamente cuando es expuesta a periodos prolongados de luz (Leyser y Day, 2003). Esta transición de fase se lleva a cabo en el meristemo apical del tallo por medio de la inducción de genes como *SOC1* y *FT* (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005).

La luz es percibida en las hojas a través de proteínas fotosensibles denominadas: fitocromos, en el caso de la luz roja y roja lejana; y criptocromos, en el caso de la luz azul. Dichas proteínas presentan dos estados, uno activo y otro inactivo. Cuando los fitocromos son foto activados se dirigen al núcleo en donde interactúan con factores de transcripción del tipo bHLH (basic helix-loop-helix). Estos factores bHLH a su vez reconocen una secuencia hexamérica (CANNTG), denominada caja E, presente en los promotores de sus genes blanco, regulando así su expresión (Quail, 2002). En *Arabidopsis*, la caja E presenta la secuencia CACGTG y es llamada caja G. Esta caja se encuentra presente en algunos de los genes involucrados en el ciclo circadiano (Franklin *et al.*, 2005).

El fitocromo PHYB en su forma activa puede unirse específicamente y de manera fotoreversible con PIF3 (proteína tipo bHLH). PIF3 es necesario para la expresión inducida de dos genes de foto-respuesta *CCA1* y *LHY*, cuyas proteínas son factores de transcripción similares a los factores de transcripción tipo MYB. Estos factores regulan la transcripción de *CAB* el cual codifica para la proteína de unión a la clorofila A y B, componente crucial del fotosistema II y que sincroniza al reloj circadiano, regulando de este modo la expresión de genes como *GI* (Revisión en Quail, 2002). *GI* por su parte, promueve la expresión de *CO* quien juega un papel determinante en el proceso de inducción floral en respuesta al fotoperiodo y la calidad de la luz (Yanovsky y Kay, 2002). Únicamente la expresión de *CO* en las hojas es capaz de inducir la floración y no así cuando se expresa en el meristemo apical del tallo (**SAM** por sus siglas en inglés, Shoot Apical Meristem), sugiriendo que la función de este gen (en este proceso) está restringida a este órgano o que en ese sitio interactúa con otros factores para inducir la expresión de *FT* (Yanovsky y Kay, 2002; Revisión en Corbesier y Coupland, 2006). Una vez que *CO* induce a *FT* el proceso de floración se desencadena. *FT* es capaz de inducir la floración si se expresa en las hojas o en el SAM en donde junto con *FD* y *SOC1* inducen la expresión de *API* (Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005).

Giberelinas

Las giberelinas (GA) son hormonas vegetales sintetizadas en general en zonas meristemáticas jóvenes (Srivastava, 2002). Se sabe que las giberelinas biológicamente activas promueven diversos procesos que incluyen: la expansión de hojas, elongación del tallo, iniciación floral, desarrollo de los órganos florales, germinación de las semillas y desarrollo de los frutos (Davies, 1995). Las giberelinas son también responsables de la aceleración en la aparición de los primordios en el ápice (la cual es una manifestación temprana de la inducción por días largos), al actuar sinérgicamente con la sacarosa para inducir la expresión de *LFY* (Simpson *et al.*, 1999).

Se reconocen al menos 125 giberelinas diferentes; todas ellas comparten la estructura de diterpenos cíclicos, pero solo algunas son activas y capaces de provocar algún efecto en la planta. Las giberelinas activas se regulan entre sí a nivel de síntesis como de efecto, por medio de mecanismos de retroalimentación negativa, lo cual podría explicar el porque de éste gran número de moléculas (Srivastava, 2002). Recientemente, se ha reportado que GA₄ es la giberelina que regula la transcripción de *LFY* (un gen FMI), y que de este modo promueve la iniciación floral en *Arabidopsis* (Eriksson *et al.*, 2006). De hecho, ya se han identificado y caracterizado los posibles receptores de giberelina en *Arabidopsis*, los cuales presentan una mayor afinidad por la GA₄. Esta giberelina es indispensable para que los “receptores” interactúen con las proteínas DELLA, reguladoras negativas de la señal desencadenada por GA, inhibiendo sus efectos represores a la respuesta a las giberelinas (Nakajima *et al.*, 2006).

Las giberelinas interactúan con otras hormonas para regular diferentes procesos de desarrollo. Por ejemplo, las auxinas inducen el crecimiento de la raíz (entre otros mecanismos) al promover la biosíntesis de las GA, las cuales desestabilizan a diversas proteínas de la familia DELLA que restringen el desarrollo de las células de la raíz (Ross *et al.*, 2000; Fu y Harberd, 2003).

Interacciones proteicas

La regulación de la transcripción es uno de los mecanismos más importantes para controlar los niveles de expresión de los genes. Este tipo de regulación se lleva a cabo por diversas proteínas dentro de las cuales destacan los factores de transcripción como los codificados por los genes MADS-box (Shore y Sharrocks, 1995; Messenguy y Dubois, 2003). Las proteínas con dominio MADS son capaces de homo y heterodimerizarse formando complejos (Honma y Goto, 2001). Esto se ha comprobado por medio de ensayos modificados de doble y triple híbrido (de Folter *et al.*, 2005 y bibliografía allí citada). Este tipo de análisis ha permitido probar en algunos casos (como el de DEFICIENS, GLOBOSA y SQUAMOSA, Egea-Cortines *et al.*, 1999) e hipotetizar en otros, que algunos de los complejos son capaces de regular la identidad de los órganos de los diferentes verticilos florales (Modelo del cuarteto; Theissen y Saedler, 2001). Recientemente, se llevó a cabo un estudio extensivo de las interacciones entre las proteínas con dominio MADS con ayuda de la tecnología de doble híbrido. Este estudio, que representa el primer interactoma de plantas comprensible, muestra que proteínas con funciones relacionadas tienen la capacidad de interactuar físicamente, como es el caso de las proteínas involucradas en el desarrollo de la raíz o bien involucradas en el tiempo de floración (de Folter *et al.*, 2005). Esto abre la posibilidad de que una misma proteína pueda formar parte de complejos que lleven a cabo diferentes funciones en distintos estadios de desarrollo, como en el caso de AGL24, que participa en la señalización e integración de la respuesta a frío promoviendo la transición floral y además mantiene al meristemo como meristemo de inflorescencia (Yu *et al.*, 2004).

En este tipo de ensayos se encontró que AGL14 interactúa con AGL20/SOC1, AGL24 y AGL16. Mientras que AGL19 interactúa con SOC1 y AGL21 (de Folter *et al.*, 2005). El hecho de que tanto AGL14 como AGL19 sean capaces de interactuar con su homólogo AGL20/SOC1, uno de los integradores de las señales de las vías que inducen la floración, permite pensar que estos genes no sólo comparten una alta similitud en secuencia de aminoácidos con SOC1, sino que incluso podrían compartir funciones proteicas con éste al formar parte de un mismo complejo que regule las señales provenientes de las distintas vías.

RESÚMEN

En *Arabidopsis thaliana* la transición floral es regulada por al menos cuatro vías: la del fotoperiodo, la autónoma, la de vernalización, y la dependiente de giberelinas. Estas vías están constituidas por una serie de genes que interactúan entre sí conformando una red compleja de regulación, la cual monitorea el estado de desarrollo de las plantas, así como las condiciones ambientales (como luz y temperatura) determinando el momento preciso para florecer .

Muchos de los genes involucrados en la regulación de la transición floral pertenecen a la familia de genes MADS-box, los cuales además juegan papeles importantes en la regulación de la determinación de la identidad del meristemo, de los primordios y de los órganos florales.

AGL14 y *AGL19* son genes MADS-box cercanamente relacionados con *AGL20/SOC1*, uno de los genes que integra las señales provenientes de diferentes vías de inducción floral (giberelinas, vernalización y fotoperiodo) y que promueve el proceso de floración.

El objetivo del presente proyecto fue determinar el papel funcional de los genes *AGL14* y *AGL19* en las vías de regulación de la transición a la floración por medio de la caracterización molecular y fenotípica de una línea mutante por inserción de transposón en el gen *AGL14* (*wagl14.5-1*) y dos líneas mutantes por T-DNA del gen *AGL19*.

AGL14 se expresa a partir de estadios tempranos de desarrollo, y a diferencia de los reportes previos en los que se muestra como específico de raíz en este trabajo se encontró que se expresa en otros órganos tales como hojas de roseta y caulinares, primordios florales y en el meristemo vegetativo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la expresión de *AGL14* esta regulada por procesos mediados por la luz. Durante un ciclo circadiano de fotoperiodo largo se observó un pico de expresión a las cuatro horas de que se encienden las luces. Y, por otro lado, el mRNA de *AGL14* responde al incremento en la duración de horas luz, mostrando expresión en las hojas de roseta después de un día de inducción y transitorio, ya que disminuye hacia el segundo día.

La mutación en el gen *AGL14* provoca un retraso en la floración, sobretodo bajo condiciones de fotoperiodo de día corto, sugiriendo que el producto de este gen está involucrado en promover la floración al igual que *AGL20/SOC1*.

Análisis de la expresión de genes clave en la regulación del tiempo de floración de la vía del fotoperiodo en la mutante *wagl14.5-1* indican que *AGL14* parece estar involucrado en la inducción de la expresión de *FLOWERING LOCUS T*, gen que forma parte del llamado florígeno o señal metabólica capaz de inducir la floración.

AGL19 se expresa a partir de los ocho días de haber germinado y su mensajero se encuentra en todos los órganos de una planta adulta. Su nivel de expresión incrementa ligeramente hacia el final del día, y se induce en las hojas de roseta de manera transitoria cuando se incrementa el número de horas luz.

La línea mutante de T-DNA SALK_078786 de *AGL19* presenta un patrón de sobre-expresión a nivel de mensajero, mientras que la línea SALK_000234 es nula. Los análisis fenotípicos de tiempo de floración mostraron que la alteración de la expresión de éste gen afecta la correcta regulación de la transición a la floración. Además SALK_000234 presenta alteraciones en su fenotipo en condiciones de día corto.

Además de las alteraciones en el tiempo de floración la alteración de la expresión de *AGL19* afecta la expresión de algunos de los genes involucrados en la regulación de la transición de la floración como *LEAFY* , gen encargado de establecer el meristemo vegetativo como meristemo de inflorescencia.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que los genes *AGL14* y *AGL19* están involucrados en el proceso de regulación de la transición a la floración y la expresión de estos genes se ve afectada por procesos regulados por luz.

ABSTRACT

In *Arabidopsis thaliana* the flowering time transition is regulated by at least by four pathways: the photoperiod, autonomous, vernalization and gibberellin. These vias are conformed by several genes which are able to interact in such a way that they conform a complex regulation network. This network sense the developmental state of the plant as well as the ambiental conditions, like light and temperature, in order to set up the right moment to flower.

Several of the genes involved in the regulation of the flowering time transition belong to the family of MADS-box genes, which also play important roles in the regulation of the determinacy of the meristem identity, primordia and floral organs.

AGL14 and *AGL19* are MADS-box genes closely related with *AGL20/SOC1*, one of the integrator genes involved in the promotion of flowering in response to the outcoming signals of the flowering promotive pathways.

The aim of this proyect was to determine the functional roles of the *AGL14* and *AGL19* genes within the regulatory flowering time network by the molecular and phenotypic characterization of one transposon mutant line of *AGL14* (*wagl14.5-1*) and two T-DNA mutants of *AGL19* gene.

AGL14 is expressed from early stages of development, and on the contrary of the previous reports it was also found in other organs like rosette and cauline leaves, floral primordia and vegetative apical meristem.

In agreement with the obtained results, the *AGL14* expression seems to respond to some processes controled by light. During a long photoperiod circadian cycle, the *AGL14* expression reached a pick at the 4 hours after being exposed to light. By the other hand, the *AGL14* mRNA incremented in response to a short to long day shift, showing an increment of expression specifically in the rosette leaves, organ where it was not found before the induction. This response was temporary since the increment diminished considerably by the second day.

The *wagl14.5-1* mutant showed a late flowering phenotype, mainly under short day conditions, suggesting that the gene product is involved in the flowering promotion as the *SOC1*.

The analysis of the expresion of important genes involved in the regulation of flowering time in the *wagl14.5-1* background showed that *AGL14* seems to be involved in the induction of the expression of *FLOWERING LOCUS T*, an important gene involved in the “florigen”, or metabolic signal that is able to induce the flowering by itself.

AGL19 was expressed in eight days seedlings and its mRNA was find in all the analysed tissues (rosette and cauline leaves, stem, roots, floral primordia and flowers) of an adult plant. Its expression level slightly incremented at the end of the day, and it was induced in a temporary manner when the light hours were incremented.

The *agl19* line, T-DNA SALK_078786, presented an overexpression pattern, while the SALK-000234 line was a nule mutant. The phenotypical flowering time analysis showed that the alterations of *AGL19* expression influenced in the right regulation of the flowering time transition. Furthermore, the SALK_000234 line showed development alterations under short day conditions.

Finally, the alterations of the expresion of *AGL19* afected the right expresion of some of the genes involved in the flowering pathway.

The results presented in the present work let us concluded that the *AGL14* and *AGL19* genes are involved in the regulation of the flowering time transition process and that the expresion of these genes seems to be affected by processes regulated by light.

JUSTIFICACIÓN

AGL20/SOC1 es un gen MADS-box que está involucrado en regular la transición floral al integrar señales provenientes de las cuatro vías de inducción floral (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003).

Análisis filogenéticos indican que *AGL20/SOC1* se encuentra cercanamente relacionado con *AGL14* y *AGL19* (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003; Figura 3), con los cuales comparte un 64 y 69% de similitud en aminoácidos, respectivamente. Por lo que *AGL14* y *AGL19* podrían participar en la red de regulación del estado vegetativo al reproductivo junto con *AGL20/SOC1*.

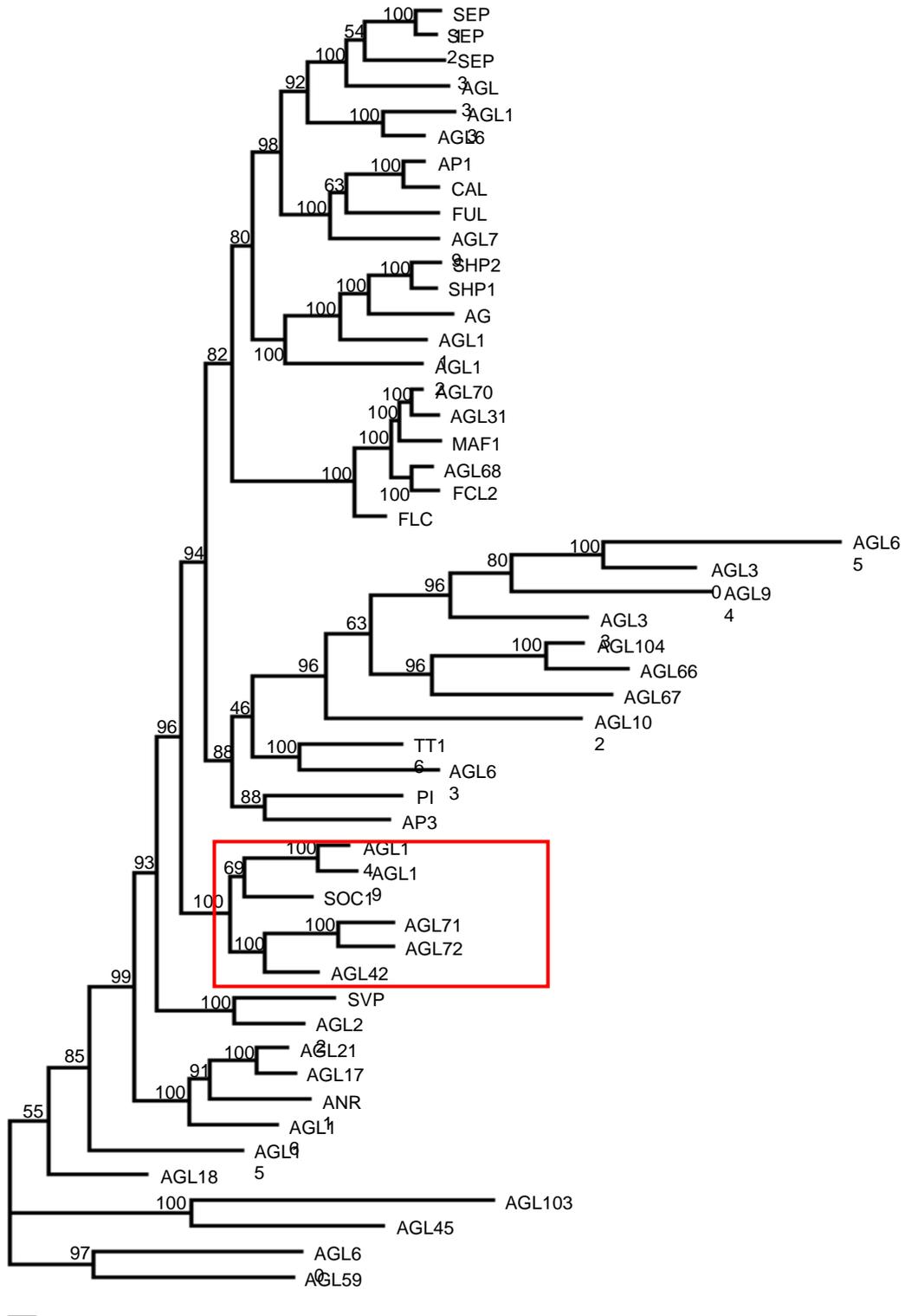


Figura 3. Reconstrucción filogenética de los genes MADS box tipo II de *A. thaliana* por métodos de máxima verosimilitud en un marco estadístico bayesiano. Los valores en los nodos del árbol representan la probabilidad posterior de encontrar ese mismo nodo. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de sitios de cambios por nucleótido. El recuadro indica el clado al cual pertenece AGL14 y AGL19 (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003).

HIPÓTESIS

Dado que los genes *AGL14* y *AGL19* comparten un 64 y 69 % de similitud en secuencia de aminoácidos con el gen integrador *AGL20/SOCI*, es posible que participen en las vías de regulación a la transición floral al igual que éste.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la función de los genes *AGL14* y *AGL19* en las vías de regulación de la transición a la floración.

Objetivos Particulares:

- 1) Caracterizar el patrón espacio-temporal de expresión de los genes *AGL14* y *AGL19*
- 2) Caracterizar a los genes *AGL14* y *AGL19* en las vías de regulación de la floración por medio de una aproximación de genética reversa
- 3) Determinar las interacciones genéticas de *AGL14* y *AGL19* con otros genes relacionados con la red de regulación de la transición a la floración.

ANTECEDENTES

AGL14 se localiza en el cromosoma IV y cuenta con un total de siete exones. Presenta un marco de lectura abierta de 663 nucleótidos que codifica para una proteína con dominio MADS. Además comparte 64% de similitud de aminoácidos con su homólogo *AGL20/SOC1*, uno de los genes integradores que juega un papel importante en la regulación de la transición a la floración.

Actualmente, se cuenta con dos líneas homocigotas mutantes por transposón, las cuales fueron transformadas con el transposón del tipo *En-1/Spm* (Bauman *et al.*, 1998; Wisman *et al.*, 1998): la *wagl14.6-2*, en la cual el transposón se encuentra al final del cuarto exón; y la línea *wagl14.5-1*, en la cual la inserción se localiza al final del quinto exón. Ambas líneas, con número de acceso de secuencia EMBL:M 25427 en la librería de genes, provienen de un banco de semillas del Center for Functional Genomics in *Arabidopsis*, del Max Planck Institute for Plant Breeding Research de Colonia, Alemania.

En la figura 4 se muestra la caracterización molecular inicial de éstos mutantes (Ortiz-Moreno, 2002). La línea *wagl14.5-1* es nula a nivel del RNA mensajero (mRNA; Figura 4D), por lo que se empleó como herramienta para todos los análisis fenotípicos y moleculares posteriores. Por otro lado, la línea *wagl14.6-2* revierte (Figura 4C) y expresa a *AGL14* (Figura 4D), por lo que fue descartada.

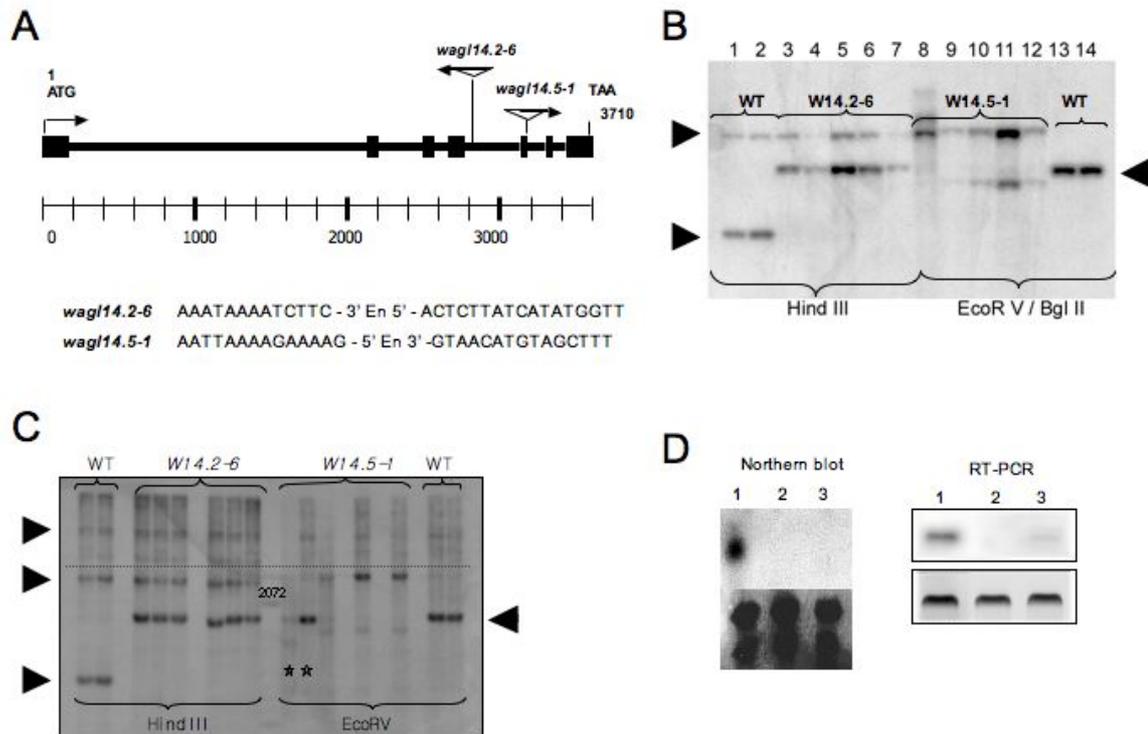


Figura 4. Caracterización molecular de las líneas mutantes por transposón de *AGL14*. (A) Diagrama de la organización genómica de *AGL14*. Los recuadros negros representan los exones y las líneas los intrones. Las flechas en los triángulos invertidos indican la orientación como se insertó el transposón en el gen, mientras que la flecha en el primer cuadro de la izquierda indica el inicio de la transcripción. Las inserciones se encuentran a las 2816 bases (*wagI14.2-6*) y a las 3167 bases (*wagI14.5-1*). Se muestran además las secuencias que flanquean el sitio de inserción. (B) Southern blot en el que se muestran los individuos homocigotos para cada una de las inserciones; carriles 4 y 7 para la línea *wagI14.2-6*, y los carriles del 8 al 12 para la línea *wagI14.5-1*. (C) Southern blot que muestra individuos homocigotos e individuos que revirtieron para las dos líneas mutantes. Todos los individuos analizados para *wagI14.2-6* revirtieron, mientras que únicamente dos (señalados con estrellas) revirtieron en el caso de la línea *wagI14.5-1*. 2072 representa el marcador de peso molecular empleado como referencia. (D) De izquierda a derecha se muestran: Northern blot de *AGL14* como sonda; y control cuantitativo los RNAs ribosomales; y, RT-PCR a partir del vástago aéreo de plántulas de 12 días de edad. Los carriles corresponden a: 1) Wt, 2) *wagI14.5-1* y 3) *wagI14.2-6*. Las flechas negras en B y C indican las bandas encontradas en el genoma de la planta silvestre ecotipo Columbia al ser digerido con las enzimas de restricción que se indican al pie de cada figura y ser hibridadas con la sonda del gen *AGL14*. B, C y el northern en D fueron tomadas de Ortíz-Moreno, 2002.

AGL19 se localiza en el cromosoma IV y cuenta con un total de siete exones. Presenta un marco de lectura abierta de 657 nucleótidos que codifica para una proteína con dominio MADS. Comparte un 69% de similitud en secuencia de aminoácidos con su homólogo *AGL20/SOCL1*.

Actualmente se cuenta con dos líneas homocigotas mutantes por T-DNA, en el ecotipo Columbia, provenientes de la colección del SALK Institute: la SALK_078786, en la cual el T-DNA se encuentra en el primer intrón a 499 pb del inicio de la transcripción (ATG); y la línea SALK_000234, en la cual el T-DNA se localiza en el cuarto intrón a 2460 pb del inicio de la transcripción (Figura 5A). La línea SALK_000234 es nula a nivel de mensajero (mRNA) al menos en la parte aérea, mientras que la línea SALK_078786 presenta altos niveles de expresión (Figura 5D).

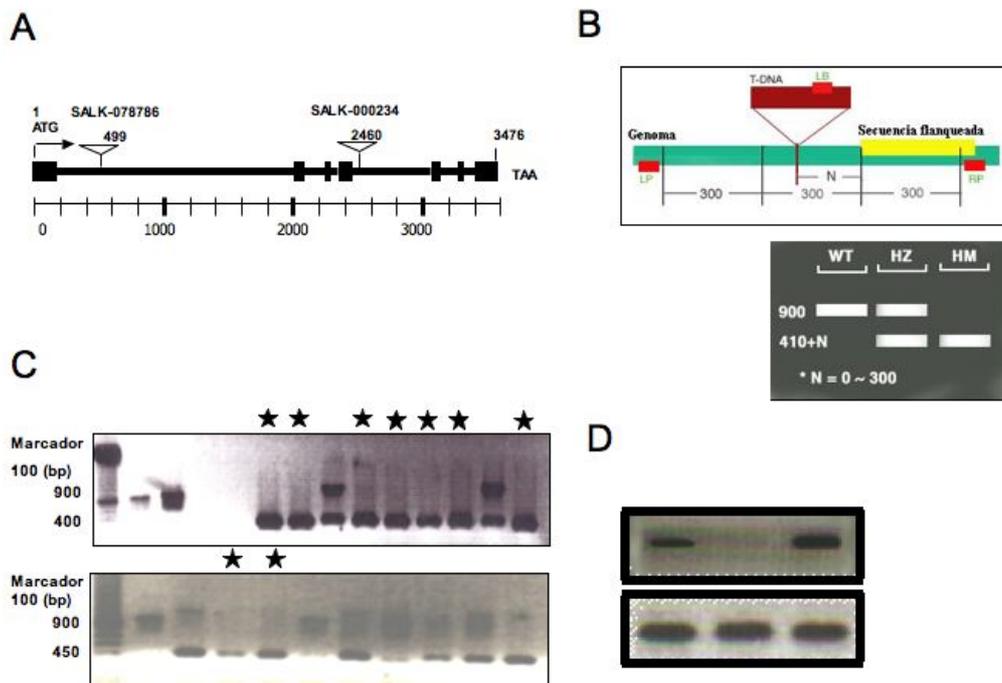


Figura 5. Caracterización molecular de las líneas mutantes por T-DNA de *AGL19*. (A) Diagrama de la organización genómica de *AGL19*. Los recuadros negros representan los exones y las líneas los intrones. Las triángulos invertidos indican los sitios donde se encuentran las inserciones (B) Diagrama explicativo para el proceso de selección de homocigotas. Modificado de <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html> (C) PCR para seleccionar homocigotas de las líneas SALK_5N78786 (superior) y SALK_000234 (inferior). Las estrellas indican las plantas que son homocigotas. (D) PCR del gen *AGL19* a partir de vástago aéreo 24 días en LD. Los carriles corresponden de izquierda a derecha a Wt ecotipo Columbia, SALK_000234 y SALK_078786 respectivamente. Tomadas y modificadas de Villajuana-Bonequi, 2004.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas y condiciones de crecimiento

Las mutantes SALK_000234 y SALK_078786 por T-DNA de *AGL19*; *wagl14.5-1* y *wagl14.6-2* por transposón de *AGL14*; *soc1* T-DNA (SALK_138131) y *soc101D* (Lee *et al.*, 2000) se encuentran todas en el ecotipo Columbia, mientras que las mutantes *gi-3* (Koornneef *et al.*, 1991; registro SALK CS51), *co-2* (Putterill *et al.*, 1995; registro SALK CS175) y *ft-2* (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Koornneef *et al.*, 1991; registro SALK CS184) se encuentran en el ecotipo Landsberg.

Las semillas fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml y esterilizadas durante 20 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 5% y SDS al 1%, posteriormente se lavaron tres veces con agua bidestilada y se estratificaron a 4°C en oscuridad durante 2-4 días. Las placas en que se sembraron las semillas consistían de medio Murashing-Skoog (MS, Gibco BRL) al 0.2 X, sacarosa 1 %, pH 5.8.

La temperatura en la que se crecieron las plantas fue de 22°C con una humedad relativa de 60 % bajo lámparas de luz-blanca fría de intensidad de aproximadamente 110 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ en cámara Conviron. Los fotoperiodos fueron de: 16 h luz y 8 h de oscuridad en el caso de día largo (LD); o bien 8 h luz por 16 h de oscuridad, día corto (SD).

Para los experimentos de tiempo de floración, las semillas fueron sembradas en tierra (Metro-Mix 200) esterilizada (20 minutos, 120°C, 1.5 KPa) y crecidas bajo condiciones de día largo o día corto, según se indica para cada experimento.

En el caso de los experimentos de vernalización, las semillas fueron previamente esterilizadas y sembradas en placas con medio MS (0.2 X, sacarosa 1 %, pH 5.8), e incubadas por seis semanas a 4°C en oscuridad, posteriormente fueron transferidas a tierra y crecidas en fotoperiodo de día largo.

Los experimentos con giberelinas se llevaron a cabo asperjando a las plantas tres veces por semana con una solución 100 μM de GA_3 a partir de la cuarta semana después de sembrar las semillas en tierra.

Análisis de expresión

La extracción de RNA se llevó a cabo con TRIZOL (Gibco BRL; Anexo I). La cantidad y pureza relativa del RNA y DNA se cuantificó a partir de la absorbancia a 260 / 280 nm en el espectrofotómetro (SmartSpect 3000, BioRad).

Los cDNA fueron retro-transcritos a partir 1 µg de RNA. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en el rango exponencial de amplificación óptimo para cada gen y experimento (RT-PCR semicuantitativo; Anexos II y III).

El análisis de expresión espacial se realizó con RNA de los órganos: raíz, hojas de roseta, hojas caulinares, tallo, primordios florales y flores (incluyendo: sépalos, pétalos, estambres y carpelos); de plantas adultas del ecotipo Columbia. El análisis temporal se llevó a cabo a partir de plántulas completas sembradas en placas con medio MS (0.2 X, sacarosa 1 %, pH 5.8) que fueron colectadas alrededor de las 8 horas Zeitgeber¹ a los 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22 y 24 días.

El análisis de la expresión durante el ciclo circadiano y los niveles de expresión en las mutantes se realizó con el vástago aéreo de plántulas de 12 días de edad, crecidas en fotoperiodo de día largo en placas con medio MS (0.2 X, sacarosa 1 %, pH 5.8) colectadas a las 12 horas Zeitgeber.

Para el experimento de inducción por luz en meristemos y hojas de roseta se crecieron plantas silvestres en tierra bajo condiciones de día corto durante 20 días. Al llegar al periodo de obscuridad del día 20 se transfirieron las plantas a un cuarto de crecimiento con condiciones de día largo durante 25 horas para finalmente colectar los meristemos² y las hojas de roseta después de transcurrida la primera hora de luz del día 22. Los meristemos se colectaron separando una a una las hojas de roseta y cortando con bisturí el meristemo apical del tallo observando a través de un microscopio estereoscópico Olympus (Modelo SZ-CTV, Japón). El tejido fue preservado inmediatamente en nitrógeno líquido para evitar la degradación de los ácidos nucleicos (Diseño experimental modificado de Schmid *et al.*, 2003).

¹ terminología empleada en los análisis de ciclo circadiano para referirse a el número de horas efectivas de luz a las que han sido expuestas las plantas antes de llevar a cabo algún tipo de análisis.

² Los meristemos incluían la zona meristemática y los primordios jóvenes, los cuales antes de la inducción floral se desarrollan como hojas, pero si el proceso de floración se induce se desarrollan como flores.

Hibridaciones *in situ*

Para la realización de las hibridaciones *in situ* se empleó tejido de plantas silvestres crecidas en tierra bajo condiciones de fotoperiodo largo. El tejido (hojas de roseta, meristemas apicales, hojas caulinares e inflorescencias) se colectó por separado en tubos eppendorf de 2 ml para después fijarlo en FAA (Formalina – Ácido Acético - Alcohol). Posteriormente se deshidrató el tejido con concentraciones crecientes de etanol hasta llegar a una al 100 %. Una vez hecho esto, se sustituyó el etanol con concentraciones crecientes de Xileno hasta llegar al 100 % de concentración. Finalmente se embebieron en paraplast y se dejaron solidificar en moldes de metal. Se realizaron cortes de 8 µm de espesor con un microtomo MICROM (Modelo HM 315) para posteriormente montarlos en láminas Superfrost Plus (Fisher Scientific). Para la síntesis de las sondas sentido y antisentido de *AGL14* se amplificó una región específica del extremo 3' con los oligonucleótidos AGL14 SENTIDO IN y AGL14 ANTI IN (Anexo III), se clonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega), y se transcribieron *in vitro* con el “digoxigenin (DIG) RNA Labeling kit” (Roche Molecular Biochemicals). El anticuerpo se empleo a una concentración de 1:3000. La concentración a la que se empleo la sonda fue de 100 ng/ml. La hibridación *in situ* y la detección se llevó a cabo como se reporta en el protocolo de Davis Jackson (1991).

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de las pruebas de tiempo de floración se llevó a cabo una prueba de Mann-Whitney (Zahr, 1974).

RESULTADOS

En todos los experimentos de análisis de la expresión por RT-PCR se empleó como referencia a *AGL20/SOCI*, ya que es un integrador importante en las vías de regulación de la transición a la floración ampliamente estudiado (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Además, dada la relación filogenética que tiene con *AGL14* y *AGL19*, se hipotetiza que éstos últimos podrían llevar a cabo funciones similares a las que lleva a cabo *SOCI*.

Se analizaron además otros genes clave dentro de las vías de regulación de la floración como: *FT*, otro integrador y posible gen parte del llamado florigeno

(Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999); *FLC*, que es un fuerte inhibidor de la floración por medio de la represión de los integradores *SOCI* y *FT* (Michaels y Amasino, 1999; Hepworth *et al.*, 2002); *LFY*, determinante en el establecimiento del meristemo vegetativo como meristemo de inflorescencia (Weigel *et al.*, 1992); y *API*, gen que es un indicador claro de la determinación floral (Irish y Sussex, 1990).

Por otro lado se analizó a *CO*, uno de los genes que activa directamente tanto a *SOCI* como a *FT* (Putterill *et al.*, 1995; Hepworth *et al.*, 2002); y a *AGL24*, que es clave en inducir la transición floral de manera dosis dependiente en respuesta a las bajas temperaturas, es un promotor del destino de inflorescencia inhibido por *API* y *LFY*, y además mantiene un circuito de co-regulación con *SOCI* (Yu *et al.*, 2002, 2004).

Por último se consideró la posibilidad de que tanto *AGL14* como *AGL19* se encontraran al mismo nivel que *SOCI* dentro de la cascada de inducción floral, por lo que se decidió explorar el efecto de dos de los genes que regulan directamente a *CO*. *PHYB*, regulador negativo de *CO* y represor de la expresión de *FT* (Endo *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2005), así como *GI*, uno de los genes que lo regulan positivamente. (Quail, 2002; Yanovsky y Kay, 2002).

AGL14

Caracterización de la expresión de AGL14

El análisis de la expresión temporal a partir de plantas silvestres de distintas edades mostró que el mensajero de *AGL14* es perceptible a partir de los 8 días después de haber germinado o DAS (por sus siglas en inglés, Days After Sowed) hasta los 24 DAS, presentando un mayor nivel de expresión a los 14 y 22 DAS (Figura 6B). Este patrón de expresión es intermedio entre el observado para el integrador *SOCI* (6 DAS) y el promotor de la identidad floral *API* (10 DAS), sugiriendo que *AGL14* podría llevar a cabo una función intermediaria entre la integración de las vías de floración y la determinación floral.

Por otro lado, el análisis de la expresión de *AGL14* por medio de RT-PCR a partir de diferentes órganos de plantas silvestres de aproximadamente 35 DAS mostró que el gen se expresa mayoritariamente en la raíz y en menor medida en los primordios florales, esto a diferencia de lo que se había reportado de que *AGL14* era un gen exclusivo de raíz (Rounsley *et al.*, 1995). Por otro lado, *SOCI* se encontró en todos los

órganos tal y como había sido reportado (Figura 6A; Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000), lo que indica que ambos genes no comparten un patrón de expresión similar.

Durante el transcurso de un ciclo diurno *AGL14* presenta un patrón de expresión parecido al de *SOC1* durante las primeras doce horas, según muestran los análisis por RT-PCR de los niveles de mensajero a partir de plántulas de 12 DAS. Esto parece indicar que *AGL14* comparte un mecanismo de activación (sobre todo a las cuatro horas Zeitgeber donde ambos genes presentan un pico) con *SOC1*, el cual es desencadenado por la luz (Figura 6C).

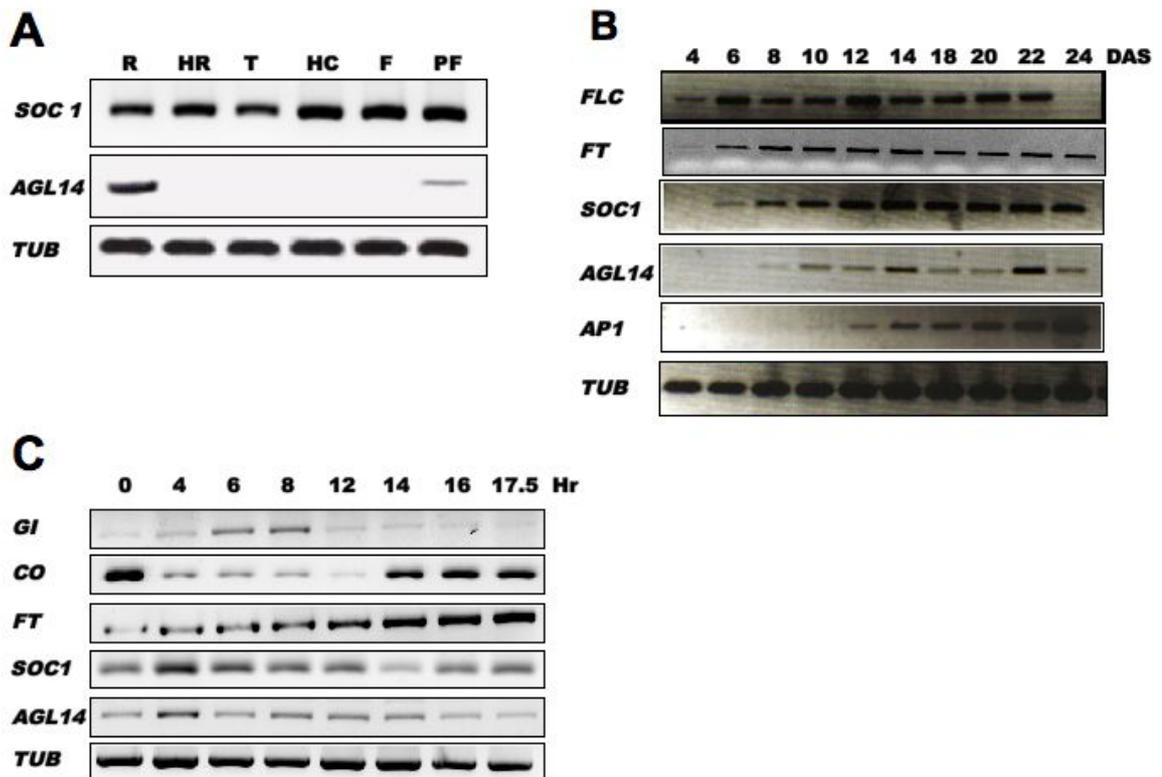


Figura 6. Análisis de la expresión de *AGL14* por RT-PCR en plantas silvestres ecotipo Columbia crecidas en fotoperiodo de día largo. (A) Expresión de *AGL14* y *SOC1* en varios órganos R:Raíz, HR:Hojas de Roseta, T:Tallo, HC:Hojas caulinares, F:Flor, PF:Primordios Florales. (B) Expresión de los genes *FLC*, *FT*, *SOC1*, *AGL14* y *API* a diferentes días. Los números indican el número de días post-siembra. (C) Expresión de *AGL14* durante el ciclo circadiano diurno y la primera hora y media después de obscurecer (17.5 hr). *GI*, *CO* y *FT* se emplearon como referencia para establecer el posible papel de *AGL14* durante este proceso, y como controles experimentales, ya que su comportamiento durante el ciclo circadiano ha sido ampliamente descrito (Mizoguchi *et al.*, 2005). Los números indican el número de horas transcurridas después de que encendieron las luces. El gen de la β -tubulina (*TUB*) fue amplificado como control cuantitativo.

Con el fin de realizar un análisis más fino de los sitios en los que se expresa *AGL14*, se realizaron hibridaciones *in situ* en órganos de plantas silvestres de distintas edades. Se encontró que la expresión está localizada en los primordios de hojas de meristemo vegetativo de 12 DAS (Figura 7A), tejido que no había sido analizado por separado mediante RT-PC pero que no había sido descartado de los posibles sitios en los que se expresaba *AGL14*, ya que este gen se expresa desde los 8 hasta los 24 DAS (Figura 6B). También se encontró una señal en el tejido vascular tanto de hojas de roseta como caulinares (Figuras 7B y 7C), la cual no pudo detectarse por medio de RT-PCR, esto debido quizás a que la edad de las plantas a partir de las cuales se obtuvo el tejido es de 25 DAS y por tanto no coincide con el número de DAS del experimento de expresión en diferentes órganos. En el meristemo de inflorescencia se observa en las capas más externas del meristemo y en parte de la región central (Figura 7D). Por otro lado los análisis de las hibridaciones *in situ* en primordios florales mostraron que *AGL14* se expresa en las células del ápice de los primordios que darán origen a los estambres y carpelos (Figura 7E). Conforme la flor se desarrolla, el sitio de expresión se restringe a los óvulos en los carpelos, y al *tapetum* y al polen en las anteras, sugiriendo que el gen podría jugar un papel en la órgano génesis floral (Figuras 7F-I). El que la expresión del gen disminuya considerablemente conforme la flor se desarrolla permite pensar que quizás la expresión es transitoria, como lo indican los resultados de RT-PCR en los que se observa un decremento en los niveles de mensajero a los 24 DAS (Figura 6B).

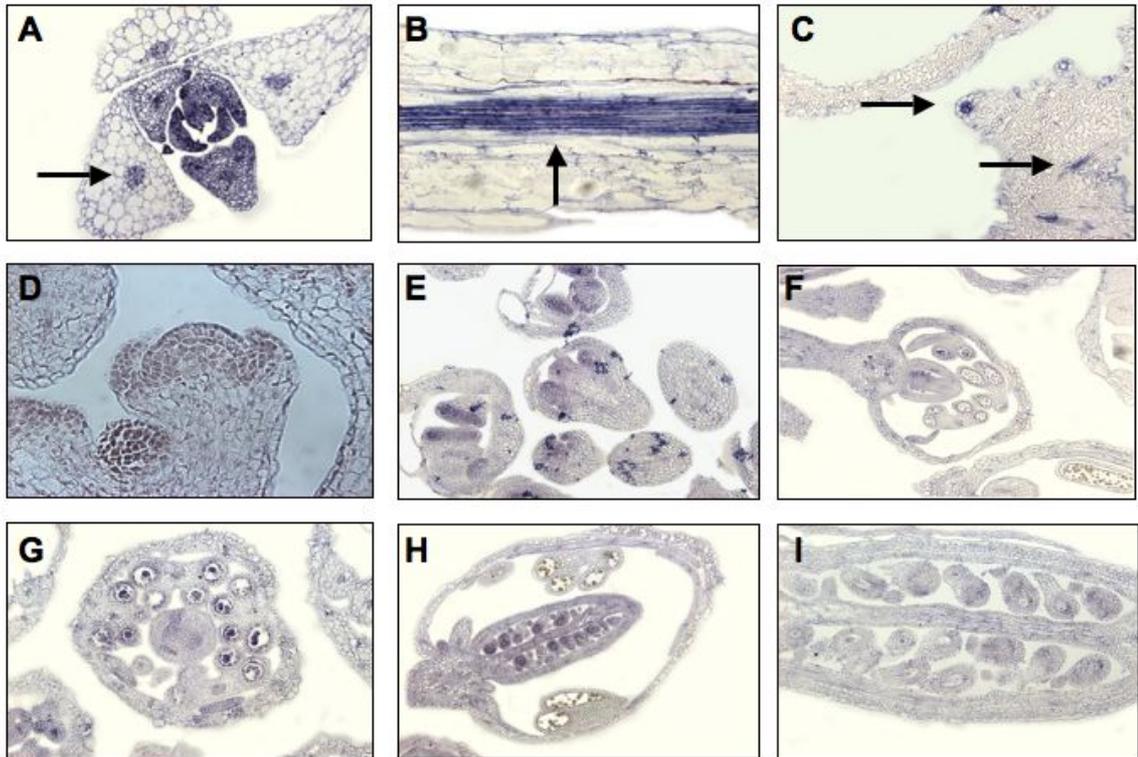


Figura 7. Patrones de hibridaciones *in situ* con la sonda antisentido de *AGL14* en plantas silvestres del ecotipo Columbia crecidas en fotoperiodo de día largo. (A) Corte transversal del meristemo apical vegetativo en el que se observa la expresión en todas las células de las hojas recién formadas y únicamente en el tejido vascular de las hojas adultas. (B) Corte longitudinal de una hoja de roseta. (C) Corte longitudinal de una hoja caulinar en donde se observa expresión en los iátodos y el tejido vascular. (D) Corte longitudinal de un meristemo de inflorescencia. (E y F) Expresión en flores en diferentes estadios de desarrollo (especificados en Anexo IV). (G) Corte transversal de una flor. (H) Corte longitudinal de una flor. (I) Detalle de óvulos. Las flechas indican el tejido vascular. Los controles negativos se encuentran en el Anexo IV.

Con el fin de tener un análisis más detallado de la expresión de *AGL14* en el meristemo apical del tallo se llevaron a cabo hibridaciones *in situ* en plantas de 8, 14, 20 y 30 DAS. Se encontró que *AGL14* se expresa en las plantas de 8, 14 y 20 DAS (Figura 8A, B y E) en los mismos tejidos que se habían observado en el experimento anterior (Figura 7A), es decir, en el tejido vascular, los primordios y las hojas jóvenes. Este patrón de expresión es muy similar al presentado por *SOCI* en plantas de 8 y 12 DAS (Figura 8C y D; tomadas de Lee *et al.*, 2000). En el caso de las plantas de 30 DAS la expresión disminuye drásticamente sino es que desaparece, en comparación con los estadios anteriores (Figura 8F). Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis de expresión temporal llevados a cabo anteriormente (Figura 6B).

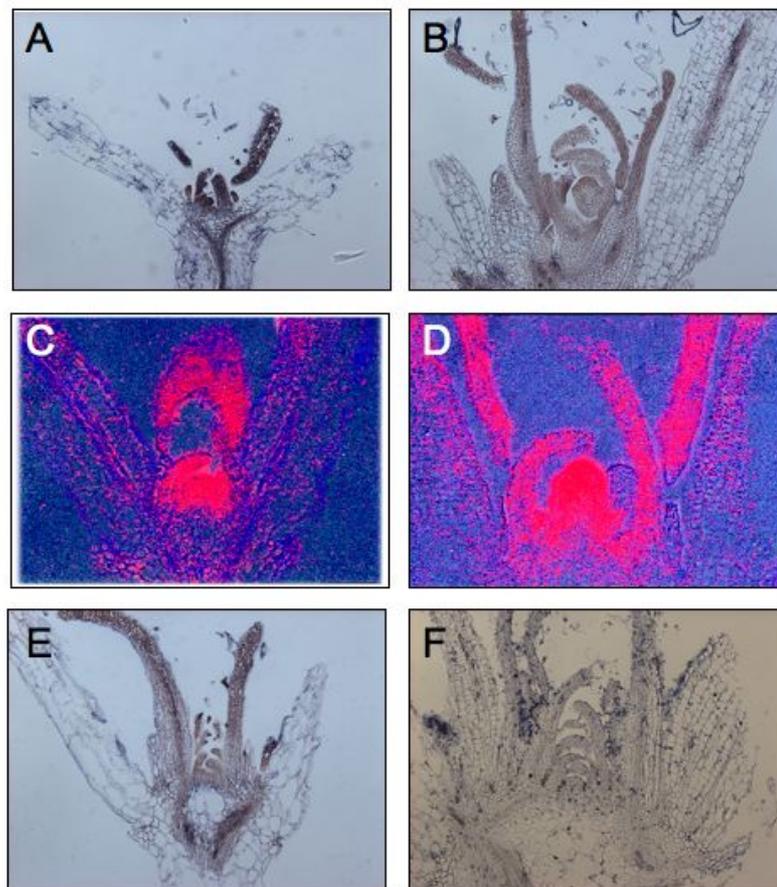


Figura 8. Patrones de hibridación *in situ* con las sondas antisentido de *AGL14* y *SOCI* en cortes longitudinales del Meristemo Apical (SAM) de plantas silvestres del ecotipo Columbia crecidas en fotoperiodo de día largo. (A-B) Patrón de expresión de *AGL14* a los 8 y 14 DAS, respectivamente. (C-D) Patrón de expresión de *SOCI* a los 8 y 12 DAS, respectivamente (Tomadas de Lee *et al.*, 2000). (E-F) Patrón de expresión de *AGL14* a los 20 y 30 DAS, respectivamente. Los controles negativos se encuentran en el Anexo IV.

Arabidopsis es una planta que florece en respuesta a la extensión de la duración del día (cambio de SD a LD). Esta señal, desencadenada por la luz, induce la expresión de genes que promueven la floración. Es por esto que el análisis de la expresión de un gen antes y después de este cambio, permite determinar si está involucrado en este proceso. El gen *AGL14* se induce en respuesta a la extensión de horas de luz en las hojas de roseta de plantas crecidas durante tres semanas bajo condiciones de día corto (Figura 9B). Este incremento en la expresión decrece hacia el segundo día sugiriendo que *AGL14* actúa como una señal importante para el proceso de transición floral y que, además, responde de una manera transitoria a la señal provocada por la luz. Experimentos previos muestran que *SOC1* se induce en las hojas de roseta a las 8 horas del cambio de SD a LD (Wigge *et al.*, 2005). En nuestros experimentos (25 horas después del cambio de SD a LD) la expresión de *SOC1* decrece ligeramente en las hojas de roseta. Por otro lado, la expresión de *SOC1* en el meristemo no parece estar afectada (Figura 9B).

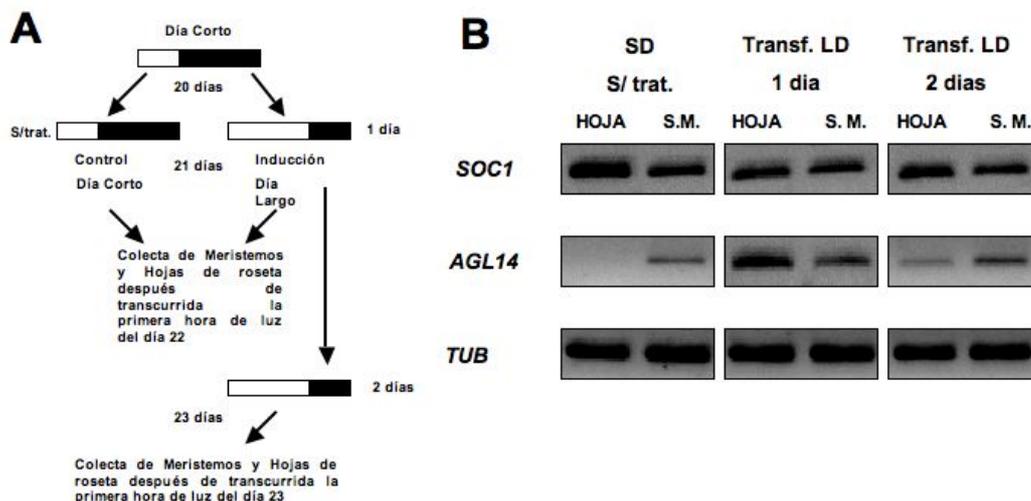


Figura 9. Análisis de la expresión de *AGL14* y *SOC1* en plantas silvestres ecotipo Columbia después de una inducción con luz (cambio de SD a LD). (A) Diagrama explicativo del experimento. (B) RT-PCR de los genes *AGL14* y *SOC1*. El gen de la β -tubulina (*TUB*) fue amplificado como control cuantitativo.

Análisis del tiempo de floración de la mutante *wagl14.5-1*

La mutante *wagl14.5-1* presentó un retraso en el tiempo de floración bajo el fotoperiodo de día largo (Figura 10A). Dicho fenotipo no se complementa ni con vernalización (Figura 10C) ni con el tratamiento con giberelinas (Figura 10D). En el caso del día corto se observó el fenotipo más conspicuo ya que la mutante no floreció durante el tiempo que se llevó a cabo el experimento (120 DAS; Figuras 10D y 11). Estos resultados van en la misma dirección que los presentados por *SOCI*, cuya mutante presenta un retraso en la floración bajo días largos, días cortos, y una sensibilidad reducida al tratamiento con giberelinas (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003).

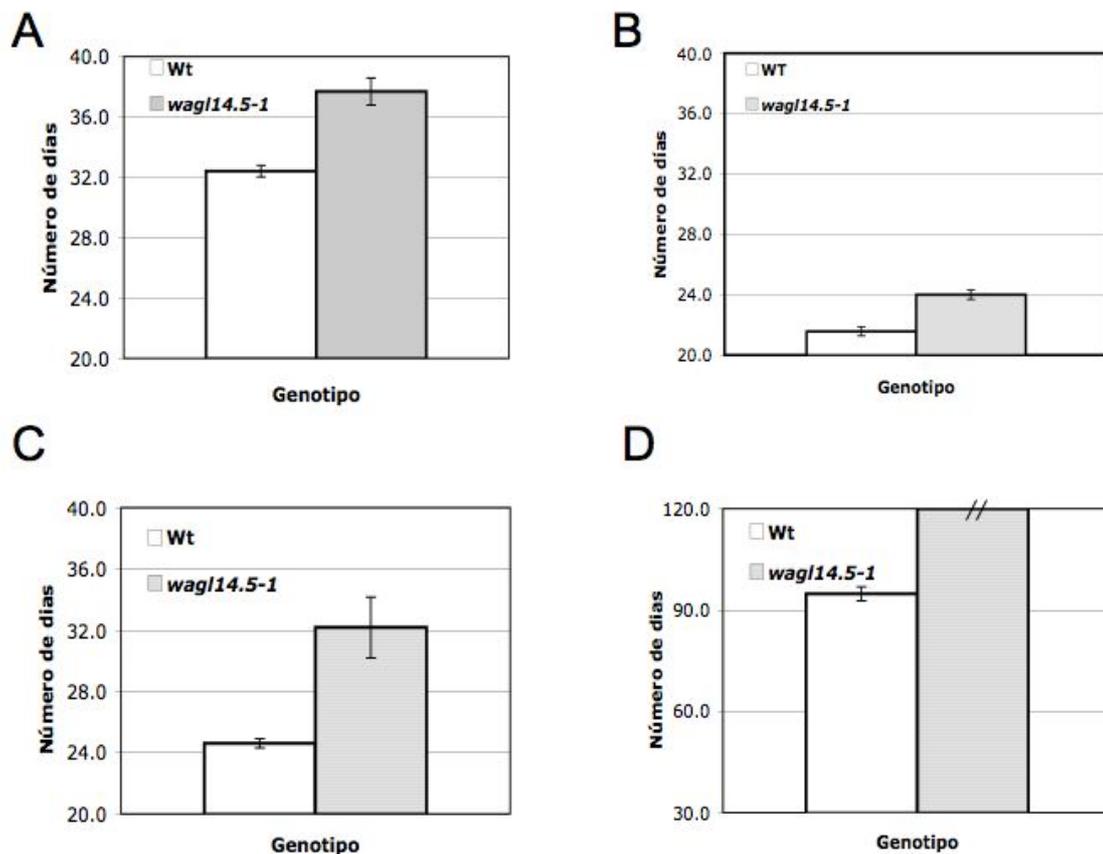


Figura 10. Respuesta de la mutante *wagl14.5-1* a las condiciones de fotoperiodo, vernalización y giberelinas. (A) Fotoperiodo largo (LD; 16h luz, 8h oscuridad). (B) Vernalización (6 semanas, 4°C), antes de crecerlas en LD (C) Tratamiento con giberelinas (100 μM, tres veces por semana) en LD. (D) Fotoperiodo corto (SD; 8h luz, 16h oscuridad). En el que la mutante no floreció durante el tiempo que duró el experimento, indicado como las líneas paralelas en la parte superior de la gráfica. El tiempo de floración se consideró como el número de días transcurridos desde la siembra hasta la antesis. Las barras de error indican la desviación estándar de la media (n ≥10).

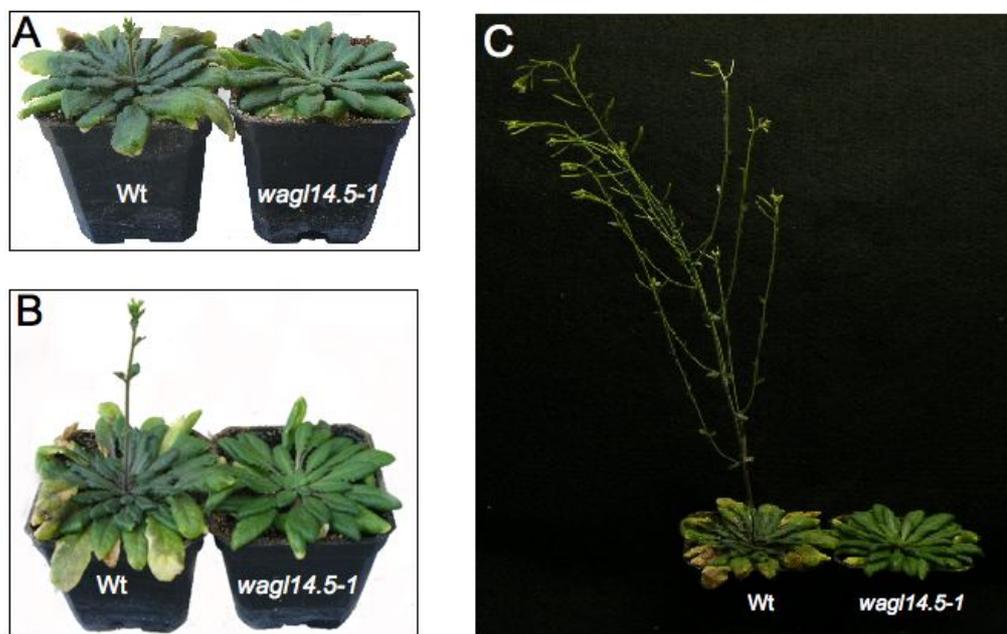


Figura 11. Fenotipo de la mutante *wagl14.5-1* crecida en día corto. (A) Vista lateral de plantas de aproximadamente 80 días de edad en las que se observa el escape en la planta silvestre. (B) Plantas de aproximadamente 90 días de edad. La planta silvestre presenta su primera anthesis. (C) Plantas de aproximadamente 110 días de edad. La planta silvestre ha producido numerosas vainas e inflorescencias secundarias mientras que la mutante continua sin producir el escape.

Interacción de AGL14 con las vías de fotoperiodo y autónoma

Con el propósito de analizar la relación del gen *AGL14* con algunos de los genes de fotoperiodo (*PHYB*, *GI*, *CO*, *FT*, *SOCI*), de la vía de vernalización (*FLC* y *AGL24*) y algunos genes FMI (*LFY* y *API*, justificación en las páginas 16 y 17), se compararon los niveles de transcrito de los genes mencionados en plantas silvestres del ecotipo Columbia y la línea mutante del gen *AGL14* (*wagl14.5-1*) por medio de RT-PCR. Se utilizaron plantas de 12 DAS crecidas bajo condiciones de día largo y se analizaron las expresiones por medio de RT-PCR semicuantitativo. Se observó una acumulación menor de transcritos de *GIGANTEA* y *FT* en la mutante *wagl14.5-1* en comparación con las plantas silvestres (Figura 12A). Al mismo tiempo se realizó el análisis de la expresión de *AGL14* en el fondo mutante de los genes *gi-3*, *co-2*, *ft-2*,

soc1 y la línea de sobre-expresión de *SOC1* por activación de su promotor (*soc101D*) encontrándose una disminución en la expresión de *AGL14* en la mutante *gi-3* (Figura 12 B). Estos resultados sugieren un posible circuito de regulación negativa entre *AGL14* y *GI*. Sin embargo este resultado es sospechoso, ya que se ha demostrado que los niveles de mensajero de *CO* disminuyen en el fondo mutante de *GI* (Suárez-López *et al.*, 2001; Mizoguchi *et al.*, 2005), lo que no se observa en nuestros resultados (Figura 12A y 12B). Por otro lado, se observa un decremento en la expresión de *AGL14* en la mutante *soc1* y un incremento en la línea de sobre-expresión *soc101D* (Figura 12C) sugiriendo que *SOC1* regula de manera positiva la expresión de *AGL14*.

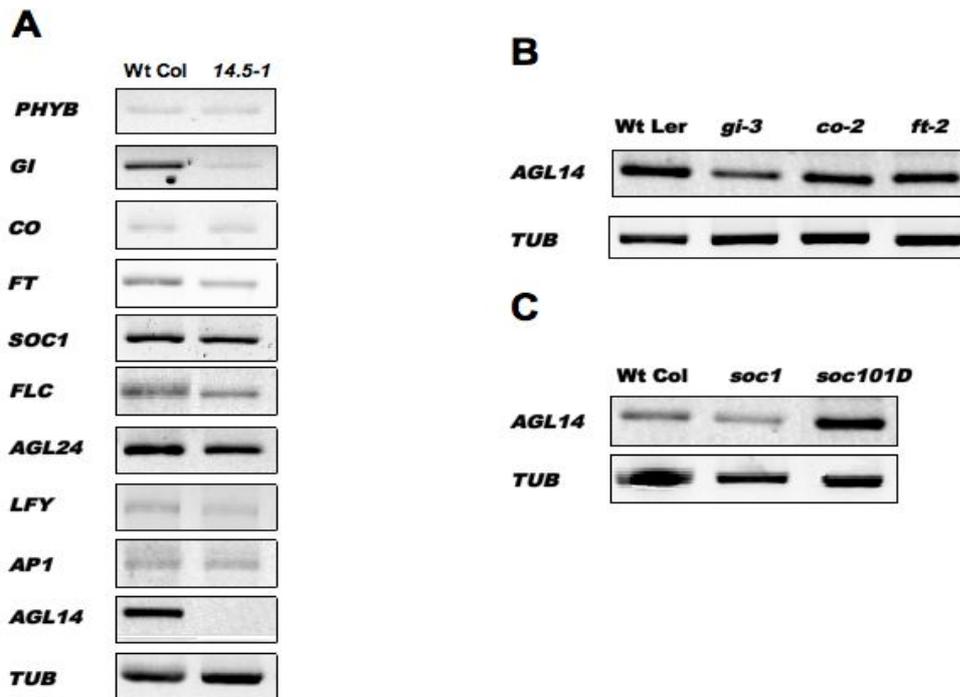


Figura 12. Análisis de la expresión por RT-PCR de algunos genes de la red de regulación de la transición floral y de *AGL14*. (A) Expresión de *PHYB*, *GI*, *CO*, *FT*, *SOC1*, *FLC*, *AGL24*, *LFY*, *AP1* y *AGL14* en la mutante *wagl14.5-1*. (B) Expresión de *AGL14* en las mutantes de floración tardía en el ecotipo Landsberg *gi-3*, *co-2* y *ft-2* (C) Expresión de *AGL14* en la mutante de pérdida de función por T-DNA *agl20/soc1* y la línea de sobre-expresión *soc101D* en el ecotipo Columbia. El gen de la β -tubulina (*TUB*) fue amplificado como control cuantitativo.

DISCUSIÓN AGL14

AGL14 se expresa en otros órganos además de la raíz a diferencia de lo que había sido reportado por Rounsley (1995). Esta discrepancia en los resultados podría deberse a una limitante metodológica, ya que se requiere incrementar el número de ciclos de PCR para observar la expresión en los primordios florales (Figura 6A).

AGL14 comienza a expresarse después de los genes *FT*, *FLC* y *SOCI* y poco antes de que comience la expresión de *API*, un gen importante en el establecimiento de la identidad del meristemo floral (Figura 6B), permitiéndonos pensar que *AGL14* podría llevar a cabo funciones relacionadas con la transición de fase del estado vegetativo al reproductivo al igual que su homólogo *SOCI* y el gen *AGL24* (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004).

En los ensayos de hibridación *in situ* se encontró que *AGL14* se expresa en el meristemo apical del tallo, en las hojas jóvenes y en el tejido vascular de las hojas desarrolladas (Figura 7A-C). Además, en los botones florales se observó en las regiones que darán lugar a los estambres y carpelos. Conforme estos órganos se diferencian la expresión de *AGL14* se restringe a la parte distal de los carpelos y estambres, hasta observarse únicamente en los óvulos y en el *tapetum* de los estambres (Figura 7E-I). Esto nos permite pensar que *AGL14* podría jugar un papel en la homeostasis de la transición de células indiferenciadas (capaces de dividirse) y diferenciadas. De ser así, esto querría decir que existe una función similar a la que lleva a cabo en la raíz, en donde el gen resulta importante para la producción y tamaño normal de células diferenciadas, y para mantener un reservorio de células indiferenciadas en el meristemo (Ortiz-Moreno, 2002).

La expresión de *AGL14* en el haz vascular tanto de las hojas en desarrollo, así como en las hojas de roseta y caulinares (Figura 7A-C) permite pensar en la posible función e interacción de *AGL14* con otros genes involucrados en la regulación de la transición floral que se expresan en estos sitios como *CO*, *FT*, *SOCI* y *PHYB* (Endo *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; *CO* revisado en Corbesier y Coupland, 2006). Para corroborar esta hipótesis sería necesario determinar lo que ocurre con la proteína *AGL14* y establecer si su función se ve afectada por las proteínas de *CO*, *FT*, *SOCI* y *PHYB*.

Como se mencionó, las hojas son los órganos de la planta que detectan la cantidad y calidad de la luz. En ellas se desencadenan los procesos de respuesta al fotoperiodo que posteriormente viajarán al meristemo apical (SAM) para inducir el proceso de floración (Bernier y Périlleux, 2005; Corbesier y Coupland, 2006). Los datos presentados en este trabajo muestran que la expresión de *AGL14* está regulada por procesos mediados por la luz (Figuras 6C y 9B). En los que durante un ciclo circadiano de fotoperiodo largo se observó un pico de expresión de *AGL14* a las cuatro horas Zeitgeber, el cual coincide con el pico presentado por *SOC1*, sugiriendo un posible mecanismo de inducción compartido. Por otro lado, el mRNA de *AGL14* responde al incremento en la duración del día mostrando una expresión en las hojas de roseta maduras, órgano en el cual no se observó expresión antes del proceso de inducción por luz. Esta acumulación del mRNA de *AGL14* es temporal, ya que disminuye hacia el segundo día, sugiriendo que posiblemente se requiere de *AGL14* al inicio del cambio de fotoperiodo para activar otras señales, pero no se requiere para que éstas se mantengan. En el caso del SAM pareciera no haber un cambio aparente en el número de transcritos de *AGL14*. Tampoco se observa cambio aparente en el caso de *SOC1* (Figura 9B), esto se debe quizás a que el tiempo post-inducción al que se colectaron las muestras fue insuficiente para detectar un cambio. Se hipotetiza esto ya que, en los experimentos llevados a cabo por Schmid y colaboradores (2003) se muestra que el número de transcritos de *SOC1* incrementa en el SAM hacia el tercer día, mientras que *AGL14* se reprime. Este último dato es interesante, ya que *AGL14* fue el único gen MADS-box que presentó este comportamiento, lo que nos habla de algún tipo de regulación que tendría que involucrar una comunicación entre la hoja y el SAM, parecido al que se propone para el transporte e inducción de *FT*, para el cual postulan la posible presencia de un factor X (Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Corbesier y Coupland, 2006) necesario para la transmisión de esta señal. Este factor podría ser *AGL14*, en el caso de las condiciones de SD, bajo las cuales al parecer *AGL14* tiene un fenotipo más fuerte a comparación del reportado para *SOC1* (Figura 11; Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000).

FT es el blanco principal de *CO* en el ápice (Schmid *et al.*, 2003). Bajo fotoperiodos de día largo las mutantes *co*, *ft* y *soc1* presentan un fenotipo de floración tardía, mientras que bajo condiciones de SD únicamente las mutantes *ft* y *soc1* se ven afectadas (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Onouchi *et al.*, 2000; Koorneef *et al.*, 1991). Esto indica dos cosas, una que *CO* es dispensable del proceso de inducción de la

floración bajo condiciones de SD, y por otro lado que tanto *FT* como *SOC1* integran señales importantes para la floración bajo condiciones de SD provenientes de otras vías independientes a la del fotoperiodo (Moon *et al.*, 2003). Por otro lado, los datos experimentales muestran que la expresión de *SOC1* se encuentra afectada en igual medida en la mutante de *co* que en la mutante de *ft* indicando que existe una regulación cruzada entre los dos genes blanco de *CO* (Corbesier y Coupland, 2006)

La pérdida de función de *AGL14* provoca un retraso en la floración cuyo fenotipo es más conspicuo bajo condiciones de día corto (SD; Figuras 10B y 11). Está bien establecido que durante los fotoperiodos no inductivos (SD), las giberelinas (GA) juegan un papel decisivo en la señalización para inducir la transición floral (Wilson *et al.*, 1992). Esto permitió pensar que *AGL14* podría ser un elemento necesario para la transducción de dicha señal en SD. Sin embargo, durante el tratamiento con GA bajo fotoperiodo de día largo (LD), la mutante *wagl14.5-1* floreció el fenotipo silvestre, al presentar un tiempo de floración similar al de la silvestre en condiciones de LD **sin** tratamiento. Sin embargo, la mutante *wagl14.5-1* nunca responde de igual manera a las plantas silvestres bajo ninguna de los tratamientos (Figura 10C). Es posible que esta respuesta en LD se deba a que bajo estas condiciones se involucran otros mecanismos de inducción de la floración como el mediado por luz, y no únicamente los involucrados con GA.

Se ha demostrado que existen otros blancos independientes de *SOC1* para inducir la floración bajo condiciones de SD, ya que la sobre-expresión de *SOC1* no es capaz de recuperar del todo el fenotipo de floración de la mutante de *gal-3* (gen involucrado en la biosíntesis de las GA). Como lo muestran los resultados del tiempo de floración de las plantas que sobre-expresan a *SOC1* en el fondo de la mutante *gal-3*, el cual es mayor al que presentan las líneas de sobre-expresión de *SOC1*, indicando que *SOC1* no es suficiente para compensar la función de promoción de la floración mediada por las GA. Lo que sugiere que las GA tienen varios blancos bajo las condiciones de SD por medio de los cuales promueve la floración. Acorde con este dato se mostró que la mutante nula *soc1* muestra una reducción en la sensibilidad al tratamiento con GA, pero que a pesar del retraso es capaz de florecer (Moon *et al.*, 2003). Por otro lado, las líneas de sobre-expresión y mutantes del gen *LFY* mostraron un comportamiento similar al presentado por *SOC1*. por lo que existen otros posibles blancos de las GA, uno de ellos podría ser *AGL14*. La vía de GA no regula la expresión de otros genes integradores como *FLC* y *FT*.

Por último, cabe mencionar que el tiempo que una planta tarda en florecer es generalmente registrado de dos formas: como el número de días que tarda en aparecer y abrir la primera flor (antes) denotado como “tiempo de floración” o bien como el número total de hojas producidas por una planta; ambas características están estrechamente relacionadas, sin embargo, la correlación entre éstos dos parámetros no es siempre la misma para todos los genotipos (Koorneef *et al.*, 1991; Koorneef *et al.*, 1998). Ambos parámetros han sido reportados en la literatura, aunque existe una tendencia a reportar el proceso de floración como el número de hojas de roseta, ya que éste no cambia una vez que se lleva a cabo la antesis. En el caso de la línea *wagl14.5-1*, el número de hojas de roseta bajo los tratamientos de día largo y vernalización no es significativamente distinto al número de hojas presentes en la planta silvestre (Anexo IV, Tabla 1) aún cuando exista una diferencia significativa en el tiempo de floración, por lo que se decidió reportar el proceso de floración como el número de días transcurridos hasta la primera antesis.

Se propone que en el fotoperiodo de día largo *FT* forma parte de lo que se denomina como florígeno, ya que junto con *FD* es capaz de inducir el proceso de floración sin necesidad de otros genes (Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). En el caso del fotoperiodo de día corto los mecanismos de inducción de la floración no están del todo descritos, y sólo se conocen algunos de los genes que intervienen en este proceso. Por otro lado, se sabe que tanto la proteína de *GI* (David *et al.*, 2006) así como el mRNA de *FT* (Moon *et al.*, 2003; Piñeiro *et al.*, 2003) se encuentran presentes en fotoperiodo de día corto y que bajo éstas condiciones parecen llevar a cabo su función. Por lo que es factible pensar que podrían actuar también como reguladores positivos de la floración bajo estas condiciones. Es interesante que tanto *GI* como *FT* se encuentran disminuidos en el fondo mutante de *wagl14.5-1* (Figura 11), ya que esto podría explicar en parte el fenotipo de floración tardía observado en la mutante.

AGL19

Caracterización de la expresión de AGL19

El gen *AGL19* se expresa en todos los órganos de la planta silvestre analizada al igual que su homólogo *SOC1* (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Mostró una mayor acumulación de mRNA en la raíz, hojas caulinares y hojas de roseta (Figura 13A). Su expresión en plántulas comienza a partir de los ocho DAS, y es posterior a la expresión de otros genes como *FLC*, *FT* y *SOC1*. Además aumenta paulatinamente durante el desarrollo hasta el tiempo que se analizó que fue de 20 DAS (Figura 13B). Al parecer el mRNA de *AGL19* incrementa ligeramente hacia las 10 horas Zeitgeber de manera similar al integrador *FT* (Figura 13C).

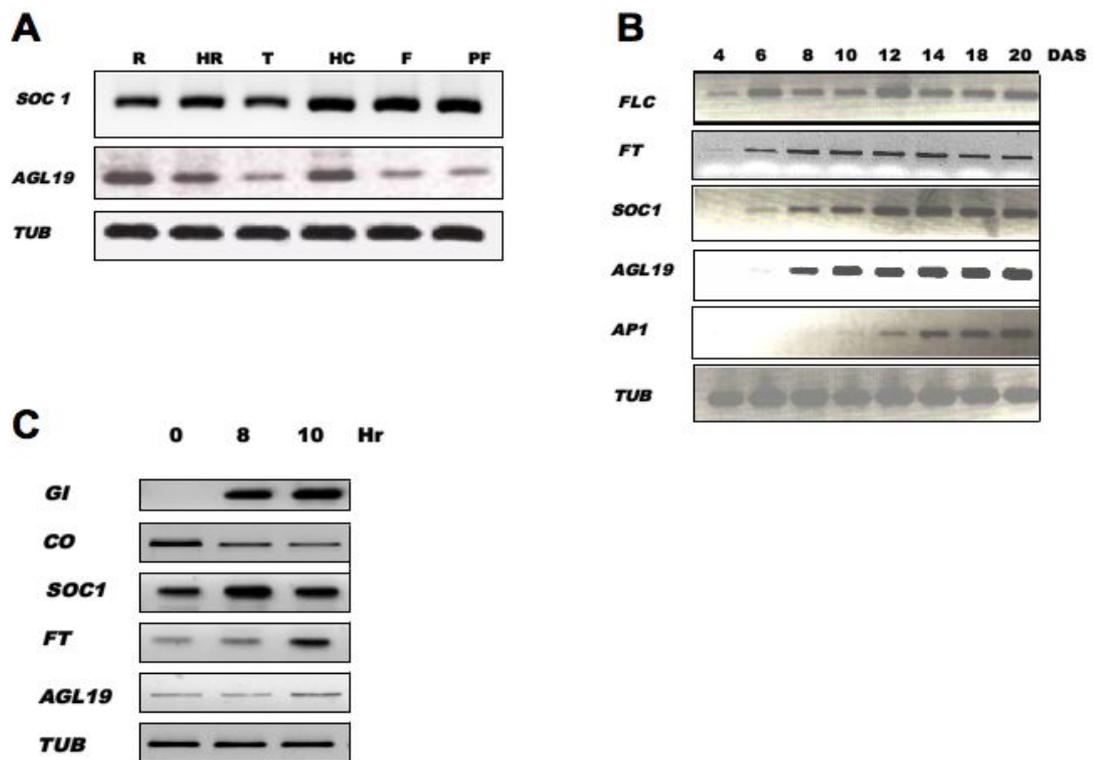


Figura 13. Análisis de la expresión de *AGL19* en plantas silvestres ecotipo Columbia crecidas en fotoperiodo de día largo por RT-PCR. (A) Expresión de *AGL19* en varios órganos R:Raíz, HR:Hojas de Roseta, T:Tallo, HC:Hojas caulinares, F:Flor, PF:Primordios Florales. (B) Expresión en el tiempo de los genes *FLC*, *FT*, *SOC1*, *AGL19* y *API*. Los números indican el número de días post-siembra. (C) Expresión de *AGL19* durante una fracción del ciclo circadiano diurno. *GI*, *CO*, *SOC1* y *FT* se emplearon como controles experimentales. Los números indican el número de horas transcurridas después de que encendieron las luces. El gen de la β -tubulina (*TUB*) fue amplificado como control cuantitativo.

El mRNA de *AGL19* se incrementa considerablemente en las hojas de roseta cuando estas se someten a un fotoperiodo de día largo después de haber crecido las plantas durante 20 días bajo condiciones de día corto (Diseño experimental explicado en la Figura 8A). Este incremento en la expresión de *AGL19* es transitorio, la expresión decrece hacia el segundo día bajo estas condiciones. La inducción por luz parece además influir en los niveles de expresión en el meristemo, en donde aparece un incremento a los dos días de tratamiento (Figura 14).

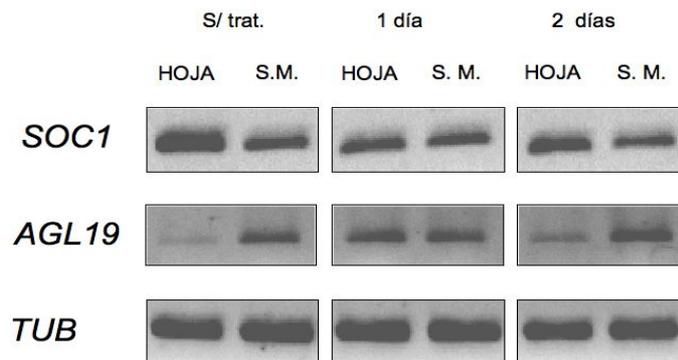


Figura 14. Análisis de la expresión de *AGL19* y *SOC1* en plantas silvestres ecotipo Columbia después de un incremento en el número de horas de luz. RT-PCR de los genes *AGL19* y *SOC1*. El gen de la β -tubulina (*TUB*) fue amplificado como control cuantitativo.

Análisis del tiempo de floración de las mutantes SALK-078786 y SALK-000234

Se analizaron los tiempos de floración de las líneas mutantes bajo dos condiciones distintas: día largo y día corto. En el fotoperiodo de día largo se aplicaron los tratamientos de vernalización y, por otro lado, de giberelinas; los cuales aceleran la floración en las plantas silvestres. La línea nula SALK_000234 no presenta alteraciones en LD (Figura 15A), responde al tratamiento de vernalización aunque no al nivel de la silvestre (Figura 15B) y es insensible al tratamiento con aplicación de giberelinas (Figura 15C). Por otro lado, la línea SALK_078786 que sobre-expresa al gen presenta un fenotipo de floración tardío en LD (Figura 15A), responde a los tratamientos de vernalización (Figura 15B) igual que el silvestre y al tratamiento con giberelinas (Figura 15C), aunque bajo éste último no alcanza el nivel del silvestre. Ninguna de las líneas presentó una diferencia significativa bajo condiciones de día corto (Figura 15B).

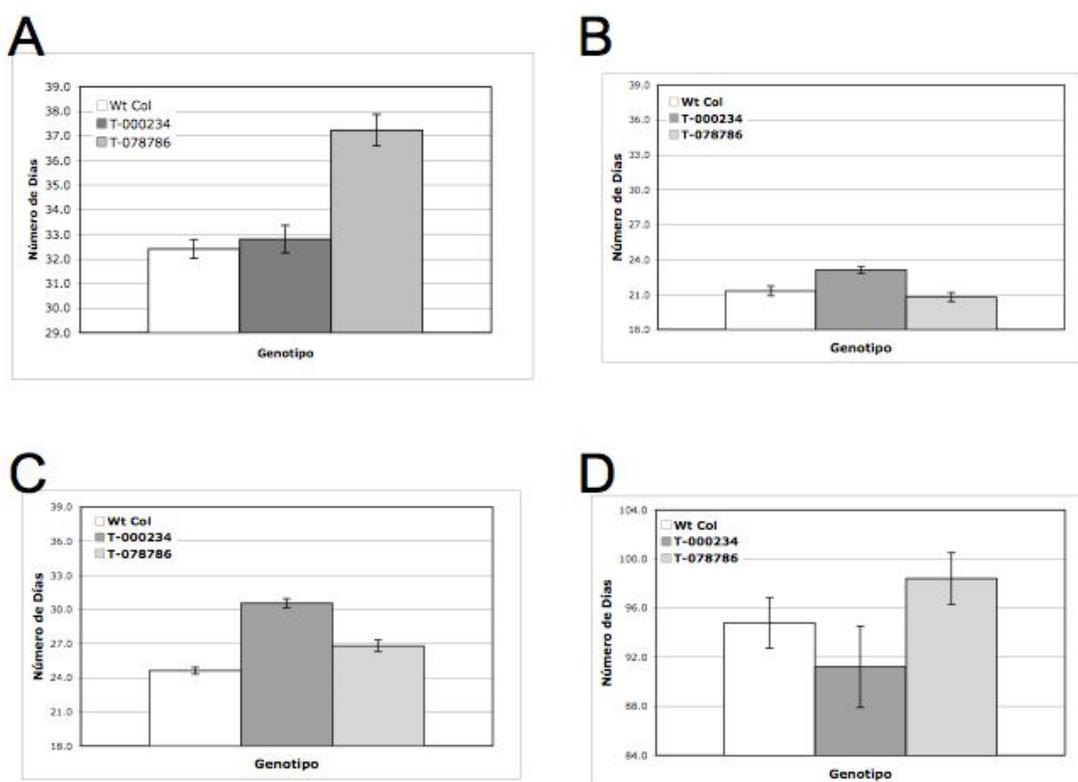


Figura 15. Respuesta de las mutantes SALK_000234 y SALK_078786 a las vías del fotoperiodo, vernalización y giberelinas. (A) Fotoperiodo largo (16h luz, 8h oscuridad). (B) Vernalización (6 semanas, 4°C). (C) Giberelinas (100 μ M, 3 veces por semana). (D) Fotoperiodo corto (8h luz, 16h oscuridad). El tiempo de floración se consideró como el número de días transcurridos desde la siembra hasta la primer antesis. Las barras de error indican la desviación estándar de la media ($n \geq 10$).

Además de las alteraciones en el tiempo de floración mencionadas, las plantas mutantes de la línea nula SALK_000234 presentan un fenotipo diferente al silvestre en fotoperiodo de día corto; este fenotipo es 100 % penetrante (40 plantas). Dicho fenotipo consiste en un incremento en la longitud del escapo (Figura 16A), la formación de un ángulo de 90 grados en el pecíolo de las primeras flores de la inflorescencia principal (Figura 16B y C) y un incremento en el tamaño de las flores (Figura 16E). Además, se observa una disminución en la longitud de las hojas de roseta, las cuales además presentan un color verde pálido y crecen ligeramente hacia arriba (Figura 16D).

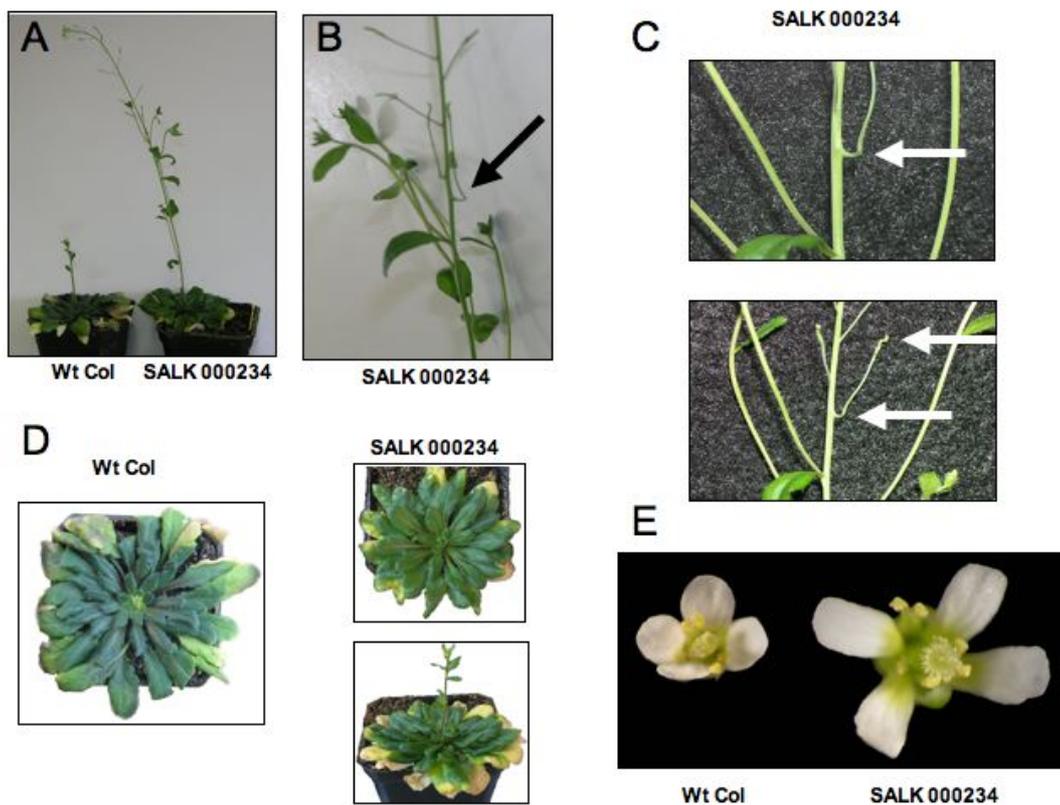


Figura 16. Fenotipo de la mutante SALK_000234 crecida en día corto. (A) Comparación de la mutante con una planta silvestre a los 90 DAS. (B-C) Detalles de la línea mutante SALK-00234 en las que se observa la formación de un ángulo de 90 grados en el pecíolo de la primera y segunda flor de la inflorescencia principal. (D) Comparación de las hojas de roseta de la planta silvestre y la línea SALK-000234. (E) Comparación de la flor de la línea silvestre y la mutante SALK_000234. Todas las plantas silvestres con las que se compara la mutante en esta figura son ecotipo Columbia.

Interacción de AGL19 con las vías de fotoperiodo y autónoma

Con el fin de determinar el efecto que tiene la alteración de la expresión de *AGL19* en la expresión de algunos de los genes involucrados en la vía de fotoperiodo y algunos de los integradores de las vías de inducción de la floración, se decidió analizar la expresión de dichos genes en el bagaje mutante de las líneas SALK_000234 y SALK_078786 separando el vástago aéreo de la raíz. Estos análisis mostraron que la expresión de *PHYB* y *GI* disminuyen en la línea SALK_078786, mientras que la expresión de *LFY* aumenta en la línea SALK_000234 (Figura 17A). Por otro lado se observa un incremento en la expresión de *CO* y *GI*, además de observarse una expresión ectópica de *FT* en la línea SALK-000234 en la raíz (Figura 17B).

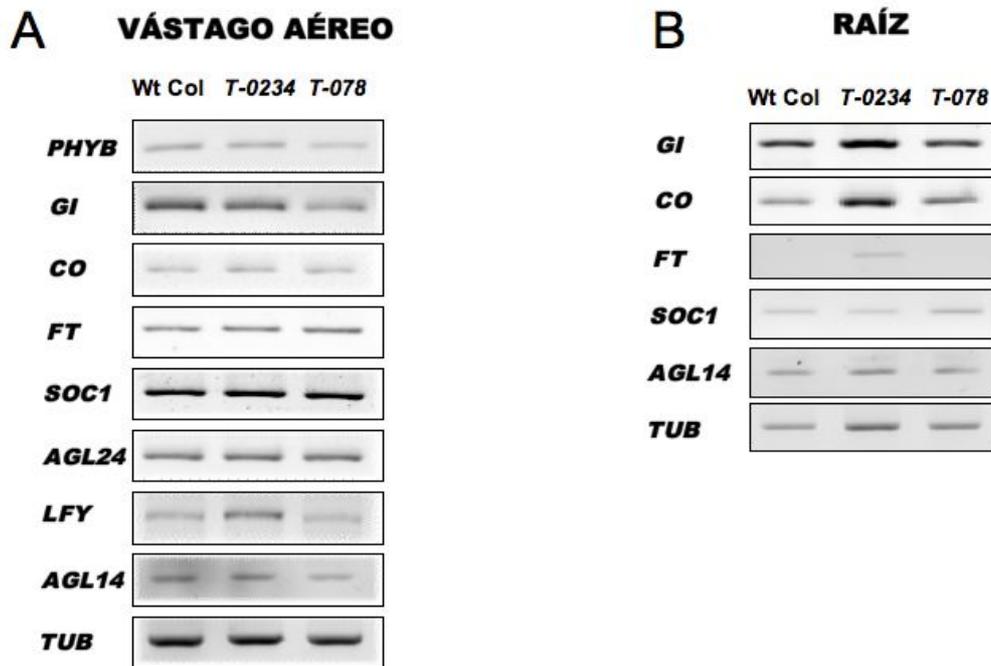


Figura 17. Análisis de la expresión por RT-PCR de *PHYB*, *GI*, *CO*, *FT*, *SOC1*, *FLC*, *AGL24*, *LFY* y *AGL14* en las mutantes por T-DNA del gen *AGL19*, SALK-000234 y SALK-078786 en el vástago aéreo (A) y en la raíz (B). El gene de la β -tubulina (*TUB*) fue amplificado como control cuantitativo. Plántulas de 12 DAS crecidas en medio MS 0.2X, 1% Sac, colectadas a las 12 hr Zeitgeber.

DISCUSIÓN *AGL19*

AGL19 se expresa en los mismos órganos que *SOC1*; es decir, la raíz, hojas de roseta, tallo, hojas caulinares, primordios florales y flores (Figura 17). Después de los genes *FLC*, *FT* y *SOC1* y poco antes de que comience la expresión de *API* durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (Figura 13B), esto sugiere que *AGL19* lleva a cabo funciones relacionadas con la transición de fase del estado vegetativo al reproductivo al igual que su homólogo *SOC1* y el gen *AGL24* (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2004).

Su expresión durante un ciclo circadiano diurno mostró que se incrementa ligeramente hacia las 10 horas Zeitgeber, de manera similar al patrón que presenta *FT*, sin embargo dicho incremento es tan sutil que sería necesario realizar nuevos experimentos para corroborar este comportamiento (Figura 13C).

El mRNA de *AGL19* incrementa considerablemente en las hojas de roseta después de una inducción por luz (cambio SD a LD), órgano en el cual se encontraba a muy bajos niveles antes de este cambio, para después disminuir considerablemente hacia los dos días posteriores del inicio de la inducción. Por otro lado, el mRNA de *AGL19* también incrementa en el SAM hacia los dos días de inducción, lo cual sugiere un posible mecanismo de señalización e inducción de la expresión en la hoja (después de un día de inducción) hacia el SAM (dos días de inducción) tal y como se sugiere para *FT* (Abe *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). Este comportamiento es disímil al presentado por *SOCl*, el cual muestra mayores niveles de mRNA en la hoja que después de la inducción y no presenta alteraciones aparentes en el SM.

En cuanto al tiempo de floración, la pérdida de función del gen no provoca alteraciones en el tiempo de floración en LD ni en SD, lo que parece indicar que la función del gen en la regulación de estas vías es independiente del fotoperiodo. Sin embargo, la alteración de la expresión del gen en el caso de la línea SALK_078786, que presenta un patrón de sobre-expresión, retrasa el tiempo de floración de la planta en LD (Figura 15A y B).

Este resultado va en dirección opuesta a los resultados presentados por las líneas de sobre-expresión con la construcción 35S::AGL19 construidas y analizadas independientemente por Schönrock y colaboradores (2006) y en el laboratorio de Genética, Evolución y Desarrollo en Plantas del Instituto de Ecología de la UNAM (Blanco-Jarvio, 2006). Estas líneas de sobre-expresión muestran un tiempo de floración de la mitad del tiempo presentado por las plantas silvestres en condiciones de LD, y de menos de una tercera parte del tiempo bajo condiciones de SD. Esta discrepancia puede deberse principalmente a que la expresión de un gen guiada por el promotor 35S del CaMV da lugar a una sobre-expresión en todos los órganos. Mientras que en el caso de la línea SALK_078786, el patrón de sobre-expresión podría deberse a la interferencia de alguno de los sitios de regulación en este gen. De acuerdo con los datos de floración, la línea SALK_078786 muestra un fenotipo de floración tardía bajo LD (Figura 15A), lo que podría sugerir la desregulación de un mecanismo de respuesta a la luz. Sin embargo, el hecho de que la línea nula SALK_000234 no presenta alteraciones dependientes del fotoperiodo sugiere que el *AGL19* no es indispensable para la respuesta a la inducción de la floración en respuesta a la luz. Quizás lo que ocurre está más bien relacionado con un comportamiento dominante negativo, en el que la proteína codificada por el mRNA de la línea mutante SALK_078786 está presente en sitios y momentos en los que

naturalmente no debería estar. Es posible que debido a esta des-regulación la proteína interactúe con otras proteínas con las que de manera natural nunca lo hace, o bien que se desregula el momento para hacerlo.

Por otra parte, la mutante de pérdida de función SALK_000234 presenta una menor sensibilidad a los tratamientos de vernalización y con GA, sobretodo este último en el que la línea presenta casi el mismo tiempo de floración que bajo condiciones del LD, mientras que la línea SALK-078786 presenta un fenotipo intermedio entre la silvestre y la línea nula (Figura 15A-C). Esto relaciona al gen muy probablemente con otros genes que integran respuestas a dichas señales como son los genes *SOCI* y *AGL24*.

LFY es un gen que responde positivamente a las giberelinas (es decir, aumenta su expresión en respuesta a esta hormona) y que además regula negativamente la expresión de *AGL24* (gen encargado de promover la floración en respuesta a la vernalización de manera independiente de *FLC*; Figura 2). La mutante de *AGL19* es insensible al tratamiento con GA y su respuesta al tratamiento con frío (vernalización) está afectada. Estos hechos podrían sugerir que *AGL19* podría estar actuando de manera similar a *LFY* (Figura 17A).

CONCLUSIONES

AGL14 se expresa a partir de estadios tempranos de desarrollo y no es un gen específico de raíz como se había reportado (Rounsley *et al.*, 1995). En este trabajo se encontró que se expresa en órganos tales como hojas de roseta y caulinares, primordios florales y en el meristemo vegetativo.

La expresión de *AGL14* esta regulada por procesos mediados por la luz. Durante un ciclo circadiano de fotoperiodo largo se observó un pico de expresión a las cuatro horas de que se encienden las luces. Además el mRNA de *AGL14* responde al incremento en la duración de horas luz mostrando una expresión en las hojas de roseta, órgano en el cual no se observó expresión antes del proceso de inducción por luz. Este inicio de la expresión es temporal (disminuye hacia el segundo día).

El gen *AGL14* parece ser un integrador de las vías de inducción de la transición floral al igual que su homólogo *AGL20/SOC1*. Ya que la línea mutante *wagl14.5-1* mostró un fenotipo de floración tardía bajo las distintas condiciones probadas.

AGL14 parece regular de algún modo la expresión de los genes “*GI*” y *FT* de la vía del fotoperiodo ya que en la mutante *wagl14.5-1* sus expresiones disminuyen, estos datos deben corroborarse por medio de repeticiones independientes. Los niveles de expresión de *FT* están relacionados con el tiempo de floración en *Arabidopsis*, por lo que esta podría ser la explicación del fenotipo de floración tardío presentado por la mutante.

AGL20/SOC1 regula positivamente la transcripción de *AGL14*. Por otro lado, ambos genes comparten sitios de expresión de mRNA espacio-temporales y, además, se ha comprobado que interactúan *in vitro* a nivel de proteína. Todos estos datos sugieren fuertemente que ambos genes interactúan de manera muy estrecha en la regulación de las vías de transición a la floración.

La pérdida de la expresión de *AGL19* altera el tiempo de floración con respecto a la planta silvestre, sin embargo el fenotipo más conspicuo se encontró en el desarrollo de las flores y algunos otros de los órganos de la planta, sobretodo bajo condiciones de SD. Esto sugiere que el gen podría estar mayoritariamente involucrado en el correcto desarrollo de los órganos florales, y muy probablemente también en la alteración de la señal que permite un correcto cambio de fase en el desarrollo, como lo sugieren los datos presentados por la línea de sobre-expresión (Blanco-Jarvio, 2006) y de pérdida de función (menor número de hojas de roseta y caulinares en SD, Apéndice III, tabla 1).

PERSPECTIVAS

Es importante analizar el nivel de transcritos de *FT* en la línea *wagl14.5-1* bajo condiciones de día corto, ya que de encontrarse suprimido sugeriría que la hipótesis de que *AGL14* funcione como el posible factor que forma parte de la señal que promueve la expresión de *FT* en el meristemo apical en SD es correcta.

Será importante analizar los tiempos de floración de *wagl14.5-1* bajo las condiciones de SD con la aplicación de giberelinas, así como después de un tratamiento de vernalización. Esto permitirá esclarecer si la mutante es capaz de responder a estos factores de inducción de la floración.

También será interesante analizar los tiempos de floración de algunas líneas de sobre-expresión de *AGL14* guiadas por el promotor 35S del CaMV, así como complementar la línea mutante *wagl14.5-1* con la secuencia codificante completa de *AGL14* para corroborar que los fenotipos son debidos solamente a este gen (ambos trabajos están en proceso).

Dado que las proteínas de SOC1, AGL24 y AGL14 interactúan *in vitro* (de Folter *et al.*, 2005) sería interesante analizar los fenotipos de las combinaciones de las dobles mutantes y el análisis de la triple mutante.

En el caso de *AGL19* será importante analizar los niveles de mRNA en distintos órganos y diferentes días en la línea SALK_078786, de manera que se defina de manera exacta en espacio y tiempo el momento en que presenta éste comportamiento de sobre-expresión, y de este modo se pueda interpretar de una mejor manera los resultados obtenidos en éste trabajo.

Ya que la mutante nula SALK-000234 presenta un fenotipo claro y penetrante bajo condiciones de SD, sería muy interesante analizar si algunos de los genes involucrados en la regulación del desarrollo y formación de los órganos florales están afectados por la alteración de la expresión de *AGL19*.

Sería importante, además, analizar si el fenotipo observado se debe a una posible desregulación de las auxinas durante la formación de los distintos órganos tanto florales como vegetativos, ya que se tienen antecedentes de que dentro de su promotor y primer intrón se encuentran sitios de regulación por auxinas y existen datos experimentales que muestran que las auxinas alteran los niveles de expresión de *AGL19* (Villajuana-Bonequi, 2004; Hyung-Kim com. pers.).

BIBLIOGRAFÍA

Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K y Araki T (2005) FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. 309: 1052-1055.

Álvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SJ, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F y Yanofsky MF (2000a) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, root and trichomes. *Plant J*. 24(4):457-466.

Álvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold SJ, Burgeff C, Ditta GS, Ribas de Pouplana L, Martínez-Castilla L y Yanofsky MF (2000b) An ancestral MADS-box duplication occurred before the divergence of plants and animals. *PNAS*. 97:5328-5333.

Álvarez J, Guli CL, Yu XH y Smyth DR (1992) *TERMINAL FLOWER*: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2:103-116.

Araki T (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Op. Plant Biol*. 4: 63-68.

Aukerman MJ y Amasino RM (1998) Floral induction and florigen. *Cell*. 93:491-494.

Ausin I, Alonso-Blanco C y Martínez-Zapater JM (2005) Environmental regulation of flowering. *Int. J. Dev. Biol*. 49:689-705.

Bauman E, Lewald J, Saedler H, Schulz B y Wisman E (1998) Successful PCR-based reverse genetics screens using an En-1 mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generate a single-seed descendent. *Theor. Appl. Genet*. 97: 729-734.

Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A y Lejeune P (1993). Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*. 5:1147-1155.

Bernier G y Périlleux C (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotech J*. 3:3-16.

Borner R, Kampmann G, Chandler J, Gleißner R, Wisman E, Apel K y Melzer S (2000) A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J*. 24:591-599.

Boss PK, Bastow RM, Mylne JS y Dean C (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting and resetting. *Plant Cell*. 16: S18-31.

Bowman JL, Smyth DR y Meyerowitz EM (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1:37-52.

Bowman JL, Drews GN y Meyerowitz EM (1991a) Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. *Plant Cell*. 3:749-758.

Bowman JL, Smyth DR y Meyerowitz EM (1991b) Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development*. 112:1-20.

Burgeff, C (2001) Genes MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*: Patrones de expresión *in situ* y análisis filogenético. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-López R, Yanofsky MF y Alvarez-Buylla ER (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214:365:372.

Davies PJ, ed.(1995) *Plant Hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*, 2nd ed. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands. 836 pp.

Chailakhyan MK (1937) Concerning the hormonal nature of plant development processes. *Doklady Akad Nauk SSSR*. 16: 227– 230.

Corbesier L y Coupland G (2006) The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.* 57(13): 3395–3403.

David KM, Armbruster U, Tama N y Putterill J (2006) *Arabidopsis* GIGANTEA is post-transcriptionally regulated by light and dark. *FEBS*. 580(5): 1193-1197.

Davis Jackson: *in situ* hybridization in plants. En: *Plant Pathology A practical Approach*. (Bowles D.J Gurr SG, y McPherson M editores) Oxford University Press 1991, p163-174.

de Folter S, Immink RGH, Kieffer M, Parenicova L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B y Angenent GC (2005) Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell*. 17: 1424–1433.

Endo M, Nakamura S, Araki T, Mochizuki N y Nagatani A (2005) Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing *FLOWERING LOCUS T* expression in *Arabidopsis* vascular bundles. *Plant cell*. 17: 1941-1952.

Eriksson S, Bohlenius H, Moritz T y Nilsson O (2006) GA4 is the active gibberellin in the regulation of *LFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell*. 18(9):2172-2181.

Franklin KA, Larner VS y Whitelam GC (2005). The signal transducing photoreceptors of plants. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 653-664.

Fu X y Harberd NP (2003) Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421:740-743.

Hartmann U, Hohmann S, Nettekheim K, Wisman E, Saedler H y Huijser P (2000) Molecular cloning of SVP: A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 21:351-360.

Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A y Coupland G (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J.* 21: 4327-4337.

Honma T y Goto K (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature.* 409: 525-529.

Huang T, Böhlenius H, Eriksson S, Parcy F y Nilsson O (2005) The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science.* 309: 1694-1696.

Irish VF y Sussex IM (1990) Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell.* 2:741-753.

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ y Weigel D (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science.* 286: 1962-1965.

Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M y Araki T (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science.* 286: 1960-1962.

Koornneef M, Hanhart CJ y van der Veen JH (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 229: 57-66.

Lee H, Suh SS, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim SG, Lee JS, Kwon YM y Lee I (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Gen. Dev.* 14:2366-2376.

Leyser O y Day S (2003) Mechanisms in plant development. Blackwell publishing. 241pp.

Martínez-Castilla LP y Alvarez-Buylla ER (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *PNAS.* 100(23):3407-3412.

Messenguy F y Dubois E (2003) Role of MADS-box genes and their cofactors in combinatorial role of gene expression and cell development. *Gene,* 316:1-21.

Michaels SD y Amasino RM (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* 11: 949-956.

Mizoguchi T, Wright L, Fujiwara S, Cremer F, Lee K, Onouchi H, Mouradov A, Fowler S, Kamada H, Putterill J y Coupland G (2005) Distinct Roles of GIGANTEA in Promoting Flowering and Regulating Circadian Rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17, 2255-2270.

Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG y Lee I (2003) The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* 35: 613-623.

Mouradov A, Cremer F y Coupland G (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* S111-S130.

Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M y Yamaguchi I (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.* 46: 880-889.

Ohshima S, Murata M, Sakamoto W, Ogura Y y Motoyoshi F (1997) Cloning and molecular analysis of the *Arabidopsis* gene *TERMINAL FLOWER1*. *Mol. Gen. Genet.* 254: 186-194.

Ortiz-Moreno, E (2002) Análisis funcional preliminar de un gen MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Piñeiro M, Gómez-Mena C, Schaffer R, Martínez-Zapater JM y Coupland G (2003) EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing *FT*. *Plant Cell.* 15: 1552-1562.

Purugganan MD, Rounsley SD, Schmidt RJ y Yanofsky MF (1995) Molecular evolution of flower development: Diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics.* 140:345-356

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R y Coupland G (1995) The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell.* 80: 847-857.

Putterill J, Laurie R y Macknight R (2004) It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays.* 26: 363-373.

Quail PH (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews.* 3: 85-93.

Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerchoffs LHJ y Elliot RC (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A₁ biosynthesis in pea. *Plant J.*, 21:547-552.

Rounsley SD, Ditte GS y Yanofsky MF (1995) Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 7:1259-1269.

Sachs RM y Hackett WP (1983) Source-sink relationship and flowering. En *Beltsville Symposia in Agricultural Research.* 6. Strategies of Plant Reproduction, WJ Meudt, ed. (Totowa NJ:Allanheld, Osmun Publishing), pp. 263-272.

Schmid M, Uhlenhaut NH, Godard F, Demar M, Bressan R, Weigel D y Lohmann UJ (2003) Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development.* 130: 6001-6012.

Shannon S y Meeks-Wagner DR (1991) A mutation in the *Arabidopsis TFL1* gene affects inflorescence meristem development. *Plant Cell*. 3:877-892.

Shannon S y Meeks-Wagner DR (1993) Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 5:639-655.

Shore P y Sharrocks AD (1995) The MADS family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229:1-13.

Simpson G, Gendall A y Dean C (1999) When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 99:519-50.

Simpson GG y Dean C (2002) *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science*. 296: 285-289.

Smyth DR, Bowman JL y Meyerowitz EM (1990) Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2: 755-767

Srivastava LM. (2002) *Plant growth and development: hormones and environment.* Academic Press. 772 pp.

Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F y Coupland G (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410: 1116-1120.

Theissen G, Kim JT y Saedler H (1996) Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43:484-516.

Theissen G y Saedler H (2001) *Plant Biology: Floral quartets.* *Nature*. 409: 469-471.

Vergara-Silva F, Martínez-Castilla L y Álvarez-Buylla ER (2000) MADS-box genes development and evolution of plant body plans. *Phycol.* 36:803-812.

Villajuana-Bonequi M (2004) Análisis preliminar de la función del gen MADS-box *AGL19* en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Weigel D, Alvarez J, Smyth AR, Yanofsky MF y Meyerowitz EM (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 69:843-859.

Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU y Weigel D (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*. 309:1056-1059.

Wilson RN, Heckman JW y Somerville CR (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* 100(1):403-408.

Wisman E, Cardon GH, Fransz P y Saedler H (1998) The behaviour of the autonomous maize transposable element *En/Spm* in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* 37:989-999.

Yanovsky MJ y Kay SA (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature.* 410: 208-212.

Yu H, Xu X, Tan EL y Kumar PP (2002) AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *PNAS.* 99 (25):16336–16341.

Yu H, Ito T, Wellmer F y Meyerowitz EM (2004) Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nature Genetics.* 36(2): 157-161.

Zahr J (1974) *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. Pp. ,109-112

Zhang H y Forde B (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407-409.

ANEXOS

ANEXO I. Extracción de RNA

Extracción de RNA con Trizol (Gibco BRL)

- 1- Moler tejido con Nitrógeno líquido
- 2- Agregar 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido
- 3- Homogeneizar en vórtex
- 4- Incubar cinco minutos a temperatura ambiente
- 5- Añadir 0.2 ml de cloroformo por ml de Trizol
- 6- Agitar con la mano durante 15 segundos e incubar a temperatura ambiente por tres minutos
- 7- Centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C
- 8- Tomar fase acuosa (superior sin color)
- 9- Precipitar con 0.5 ml de isopropanol por ml de Trizol
- 10- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- 11- Centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C
- 12- Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75%
- 13- Agitar en vórtex
- 14- Centrifugar 5 minutos a 10,000 rpm a 4°C
- 15- Eliminar sobrenadante
- 16- Secar al vacío de 5 a 10 minutos
- 17- Resuspender en agua (usualmente 20 µl de ddH₂O)

ANEXO II. RT-PCR

Síntesis de cDNA con el Kit 3' RACE

Se debe trabajar en condiciones de manipulación de RNA (usar guantes, H₂O estéril y libre de RNAsas, tubos estériles, puntas con filtro estériles y de uso exclusivo para RNA)

Síntesis de la primera cadena de cDNA

- Prender "heat blocks" a 42°C y 70°C. Luego uno a 37°C
- Descongelar los componentes del "kit" para la reacción y poner en hielo (RNA, AP, 10X PCR Buffer, MgCl₂, mezcla de dNTPs, DTT). Mezclarlos y darles un pulso a máxima velocidad en microcentrífuga antes de usar.
- Agregar un volumen de muestra correspondiente a 500 ng de RNA total en un tubo estéril de 0.5ml y llevarlo a un volumen final de 11 µl con agua tratada con DEPC
- Añadir 1 µl de la solución de "Adapter Primer" (AP) 10 µM. Mezclar y dar un pulso a máxima velocidad en microcentrífuga

-Calentar la muestra a 70°C durante 10 minutos y poner inmediatamente en hielo por lo menos durante 1 minuto. Dar un pulso a máxima velocidad en microcentrífuga.

-Agregar a cada muestra:

PCR buffer 10X	2 µl
MgCl ₂ 25mM	2 µl
dNTP mix	1 µl
0.1 M DTT	2 µl

-Mezclar, dar un pulso a máxima velocidad en microcentrífuga. Incubar a 42°C de 2 a 5 minutos

-Añadir 1 µl de SUPERSRIPT II RT (transportarla en “cold block”). Incubar la muestra a 42°C durante 50 minutos

-Incubar a 70°C durante 15 minutos para terminar la reacción

-Poner inmediatamente en hielo. Dar un pulso a máxima velocidad en microcentrífuga. Agregar 1 µl de RNAsa H. Mezclar e incubar a 37°C durante 20 minutos. Guardar la muestra de cDNA a -20°C hasta realizar PCR.

Amplificación de fragmento específico de cDNA

A un tubo de 0.5 ml agregar

PCR buffer 10X	2.5	µl	Primer (10 µM)	1	µl
MgCl ₂ 25mM	1.5	µl	Primer (10 µM)	1	µl
ddH ₂ O	17	µl	Taq DNA polimerasa	0.5	µl
cDNA	0.5	µl	dNTPs mezcla	1	µl

Mezclar y dar un pulso a máxima velocidad en microcentrífuga

-Programa de PCR según las condiciones necesarias de anealing.

**PROGRAMA PCR
ANÁLISIS CICLO
CIRCADIANO E
INTERACCIÓN CON
LAS VÍAS DE
FOTOPERIODO Y
AUTÓNOMA EN RAÍZ**

94°C - 3'
94°C - 25"
60°C - 25" 30x
72°C - 45"

72°C - 3'
4°C - 4'

**PROGRAMA PCR
INTERACCIÓN CON
LAS VÍAS DE
FOTOPERIODO Y
AUTÓNOMA EN
VÁSTAGO AÉREO**

94°C - 3'
94°C - 25"
60°C - 25" 25x
72°C - 45"

72°C - 3'
4°C - 4'

**PROGRAMA PCR
INDUCCIÓN POR LUZ,
EXPRESIÓN EN
ÓRGANOS Y
CINÉTICA DE
DESARROLLO (DÍAS)**

94°C - 4'
94°C - 30"
60°C - 30" 30x
72°C - 1'

72°C - 5'
4°C - 4'

ANEXO III. Oligonucleótidos

PHYTOCHROME B F 5' TGC TTG GTT GGT TCT ACT CT 3'
R 5' TAC TTC CCG TGG TAA AGA AA 3'

Tamaño esperado 400 pb

GIGANTEA FORWARD 5' CTT TGT CTC CAT GGA TCA GT 3'
REVERSE 5' AAG GAG TTC CAC AAG CTG TA 3'

Tamaño esperado 482 pb

CONSTANS FORWARD 5' ATC AGC GAG TTC CAA TTC TA 3'
REVERSE 5' GGA ACC ATT GTC GTT GTA GT 3'

Tamaño esperado 452 pb

SOC1 FORWARD 5' TGA GGC ATA CTA AGG ATC GAG TCA G 3'
REVERSE 5' GCG TCT CTA CTT CAG AAC TTG GGC 3'

Tamaño esperado 400 pb

FT FORWARD 5' AGA CGT TCT TGA TCC GTT TA 3'
REVERSE 5' GTA GAT CTC AGC AAA CTC GC 3'

Tamaño esperado 411 pb

LEAFY FORWARD 5' TGA AGG ACG AGG AGC TT 3'
REVERSE 5' TTG CCA CGT GCC ACT TC 3'

Tamaño esperado 500 pb

API FORWARD 5' GCA CCT GAG TCC GAC GTC 3'
REVERSE 5' GCG GCG AAG CAG CCA AGG 3'

Tamaño esperado 500 pb

AGL24 FORWARD 5' TCC ATC GAA GTC AAC TCT GCT GGA TC 3'
REVERSE 5' GTC TTC ATG CAA GTA ACA TCA AC 3'

Tamaño esperado 500 pb

FLC FORWARD 5' TTC TCC AAA CGT CGC AAC GGT CTC 3'
REVERSE 5' GAT TTG TCC AGC AGG TGA CAT CTC 3'

Tamaño esperado 596 pb

AGL14

OEAB 145 (FORWARD)

5' CAG TAG AAA GAT ATC AAA AGC GAA TAC AAG ATC TCG GGT 3'

OEAB 147 (REVERSE)

5' GGA GGA AAC TTT TTG AAG TGT CGA GTC TCA GGA GGT 3'

Tamaño esperado 425 pb

AGL14 SENTIDO IN

5' GTT TCC TCC TTC AAA CTA ACA 3'

AGL14 ANTI IN SITU

5' GCA ACT GCT AAA TTC AGT AAG 3'

Tamaño esperado 112 pb

TUBULINA FORWARD 5' AGG ACT CTC AAA CTC ACT ACC 3'
REVERSE 5' TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT 3'

Tamaño esperado 668 pb

ANEXO IV. Tablas

LD	ESCAPO	FLORACION	H. ROSETA	H.CAULINARES	N
Wt Col	30.69 ± 0.39	32.41 ± 0.39	13.19 ± 0.35	3.84 ± 0.21	32
Wagl14.5-1	36.31 ± 0.83	37.69 ± 0.89	11.85 ± 0.46	3.00 ± 0.23	26
SALK_000234	30.38 ± 0.60	32.81 ± 0.56	12.15 ± 0.48	3.54 ± 0.23	26
SALK_078786	35.23 ± 0.59	37.23 ± 0.64	15.12 ± 0.66	4.12 ± 0.18	13

VR	ESCAPO	FLORACION	H. ROSETA	H.CAULINARES	N
Wt Col	18.58 ± 0.58	21.32 ± 0.43	6.58 ± 0.21	2.47 ± 0.12	19
Wagl14.5-1	20.20 ± 0.40	24.00 ± 0.30	6.50 ± 0.10	2.60 ± 0.20	38
SALK_000234	20.24 ± 0.21	23.11 ± 0.30	6.05 ± 0.13	2.51 ± 0.08	37
SALK_078786	18.67 ± 0.44	20.78 ± 0.38	6.37 ± 0.23	2.17 ± 0.09	19

GA	ESCAPO	FLORACION	H. ROSETA	H.CAULINARES	N
Wt Col	22.30 ± 0.34	24.62 ± 0.30	8.59 ± 0.33	3.03 ± 0.14	37
Wagl14.5-1	29.83 ± 2.21	32.17 ± 1.99	10.67 ± 0.61	3.33 ± 0.49	10
SALK_000234	26.95 ± 0.35	30.54 ± 0.40	10.71 ± 0.36	3.25 ± 0.15	23
SALK_078786	24.08 ± 0.41	26.81 ± 0.52	10.22 ± 0.41	3.17 ± 0.14	36

SD	ESCAPO	FLORACION	H. ROSETA	H.CAULINARES	N
Wt Col	94.79 ± 2.07	98.16 ± 2.06	57.95 ± 2.09	8.84 ± 0.39	19
Wagl14.5-1	ND	+ 120	ND	ND	20
SALK_000234	91.20 ± 3.32	97.87 ± 3.27	46.80 ± 1.94	6.87 ± 0.49	15
SALK_078786	98.40 ± 2.11	102.20 ± 2.01	53.80 ± 3.73	8.20 ± 0.49	10

Tabla 1. Registro numérico de los tiempos de floración y otros parámetros. Los números posteriores al signo ± se refieren a la desviación estándar de la media. Los números en negritas indican que el valor es significativamente diferente al presentado por el silvestre de acuerdo con la prueba estadística de Mann-Whitney (Zahr, 1974).

FIGURA	ESTADIOS propuestos por Smyth <i>et al</i> (1990)
E	2-3 Formación del primordio floral y surgimiento de sépalos 4 Sépalos cubren el meristemo floral 5-6 Los primordios de estambres y pétalos surgen. Los sépalos rodean por completo el primordio. 7 Los primordios de los estambres largos presentan su filamento en la base
F	8 Lóculos aparecen en los estambres largos 9 Los primordios de pétalos se observan apedunculados hacia la base 10 La longitud de los pétalos iguala la de los estambres cortos
H	12 La longitud de los pétalos iguala la de los estambres largos

Tabla 2. Estadios de desarrollo de las flores mostradas en las hibridaciones *in situ* presentados en la figura 7.

Tabla 3. Controles negativos de las hibridaciones *in situ* presentados en la Figura 7.

