



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**Análisis funcional de genes MADS-box en el desarrollo de  
*Arabidopsis thaliana***

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**Rosalinda**

**Tapia**

**López**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:  
Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces  
Instituto de Ecología**

**MÉXICO, D.F.**

**Junio de 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos Institucionales**

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Universidad, por su grandeza, la libertad y la generosidad con la que me abrió sus puertas. La UNAM me ha dado la oportunidad de conocer y crecer en el saber científico, crítico, docente y de la vida en toda su extensión.

La presente tesis fué dirigida bajo la coordinación académico-científica de la Dra. María Elena Alvarez-Buylla Roces.

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por el apoyo académico proporcionado a lo largo de mis estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACyT por la beca otorgada (No. de becario 83397) para la realización de mi tesis.

Al financiamiento para la realización de este trabajo de parte de los proyectos:

- UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN203113, IN 203214, IN203814.
- CONACYT: 240180, 180380, 167705, 152649.

## **Agradecimientos Personales**

Después de tan larga travesía, es un placer agradecer a tantas personas que de diferentes maneras me apoyaron para poder llegar a buen puerto.

A la Dra. Elena Álvarez-Buylla, por permitirme formar parte de su grupo, por darme la libertad y la orientación para explorar tanto como quise sobre el desarrollo de las plantas, por su apoyo académico incondicional y por motivarme a seguir adelante aún con el paso del tiempo.

Un agradecimiento especial a mi Comité Tutorial formado por la Dra. Patricia León Mejía y el Dr. Daniel Piñero Dalmau, quienes a lo largo del doctorado hicieron aportaciones importantes y dieron dirección a muchas de mis ideas y experimentos.

Mi profundo agradecimiento a mi Comité Sinodal, formado por la Dra Gladys Cassab López, la Dra. Elena Álvarez-Buylla, el Dr. Miguel Lara Flores, el Dr. Roberto Coria Ortega y el Dr. Jesús Aguirre Linares, por su valioso tiempo, críticas y atinadas recomendaciones para mejorar notablemente la presente tesis. Debo aclarar que las limitaciones de este trabajo, son únicamente mi responsabilidad.

Durante el desarrollo del doctorado tuve la oportunidad de realizar dos estancias de investigación, que sin duda enriquecieron mi proyecto. Gracias al Dr. Martin Yanofsky de la Universidad de California en San Diego y al Dr. Ben Scheres de la Universidad de Utrecht-Holanda. Las enseñanzas de ellos y de sus grupos de trabajo fueron sumamente valiosas.

Una parte fundamental para lograr concretar la presente tesis y el artículo de *Plant Physiology* se debe al apoyo científico de la Dra. Berenice Garcia Ponce de León. Bere, muchas gracias por las largas sesiones de genética, morfogenesis,

discusión y por tu nivel crítico a mi trabajo que sin duda mejoró sustancialmente este proyecto.

El Dr. Joseph Dubrovsky, jugo un papel fundamental en el estudio morfológico de las raíces de *Arabidopsis* y su relación con las fitohormonas. Muchas gracias Joseph.

Así mismo, el Dr. Sung-Hyung Kim, por su apoyo en el análisis de las raíces, por las arduas jornadas de trabajo y muchos aprendizajes culturales y por su amistad.

Agradezco el apoyo técnico prestado por el M. en C. Rigoberto Pérez Ruíz a lo largo de este trabajo.

Agradezco el apoyo técnico prestado por el Ing. Alejandro R. González Ponce y el Ing. Erick Daniel Valle Vidal del Instituto de Ecología de la UNAM.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio Genética Molecular y Evolución, hoy Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas, espero no omitir a ninguno y si lo hago, ustedes disculparan la falta de memoria, pero no la falta de cariño. Angeles Cortes, Miguel Soto, Paty Delgado, Caroline Burgeff, Alicia Gamboa, Francisca Acevedo, Alejandra Vázquez, Rodolfo Salas, Sol Ortíz, León Martínez, Rusely Encalada, Octavio Padilla, Libertad Castro, Argelia Cuenca, Mitzi Villajuana, Amanda Ochoa, Ursula Flores, Barbara Ambrose, Esther Zuñiga, Rigoberto Pérez, Anidia Blanco, Enrique Ortíz, Berenice García y Adriana Garay. Compartimos arduas horas de trabajo, de discusión, de música y de amistad.

Mucho del trabajo de un laboratorio se debe al apoyo administrativo y logístico de personas tan valiosas como las que tuve la suerte de contar, muchas gracias Angeles Cortes Tellez y Diana Romo Ríos. Arturo Pérez y Elizabeth Núñez me apoyaron en diversas tareas del laboratorio.

Sin duda, debo un agradecimiento muy especial al Dr. Juan Núñez Farfán, por su apoyo incondicional, y enorme generosidad para que yo lograré terminar esta tesis. En el laboratorio de Genética Ecológica y Evolución he aprendido otro enfoque para estudiar genética, a las plantas y a otros organismos. Todos los chicos del laboratorio han sido siempre solidarios, cariñosos y me han hecho sentir como en casa. Muchas gracias Pily, Mariana, Marisol, Vania, Lilo, Eunice, Laura Lorena, L. Judith, Rafa, Memo, Edson, Iván, Doña Lily, Erika, Maried, Yorch, Jesús, Adriana C, Adriana Pérez y Rafa Torres.

## Dedicatorias

Esta tesis se debe en gran medida a todos aquellos que sin estar en la ciencia, están detrás de mí apoyándome cada día de forma incondicional, ayudándome a crecer, queriéndome y cuidando de mí familia.

A mi mamá, que como buena madre, no sólo se preocupa de que me arrope y coma, sino que vive preocupada por que nuestra familia esta feliz y unida y trabaja cada día para lograrlo. Gracias Meche!

A Liliana y a Violeta, mis queridas complices, que me apoyan, cuidan y quieren. Son las mejores hermanas y tías que mis hijos pudieron tener!.

A Emilio, uno de mis grandes amores, del cual estoy orgullosa y preocupada cada día para que sea feliz y alcance todos sus sueños con tenacidad y con un buen balón y una canasta.

A Pablo y Andrés, mis incansables, ocurrentes y cariñosos cachorros, los motores que cada día me hacen tener toda la energía y querer ser una mejor persona para ellos.

A Omar, mi gran compañero y amor, por su paciencia casi infinita, sabiduría, y cariño, por construir tantas cosas juntos y por lo que aú nos falta vivir.

A toda la familia López García, por su cariño y por buenos momentos que pasamos juntos. Gracias familia!

A la familia Trujillo Vázquez por acogerme con cariño y por su gran apoyo en muchos sentidos.

Con todo cariño a todos mis amigos que me han hechado porras a los largo de los años. Gracias por compartir preocupaciones, aventuras, diversion, solidaridad y haber dado alegría a mi vida. Para la Susana, Lety, Bere, Jasminka, Laurita, Marce, Olivia, Adriana, Fernando, José-JJ, Rosa, Elleli, María, Erika, Ale, Miguelo, León. Se que hay mucha mas gente que me quiere y que tal vez omite por falta de memoria, pero todos son más que correspondidos.

Finalmente de forma muy especial y con todo mi cariño al Dr. Miguel Angel Soto Arenas, un gran científico y mi gran amigo, crítico, apapachón y generoso. Con quién compartí tantas cosas de la ciencia y de la vida, mi gusto y amor por las orquídeas no fue totalmente innato. Va por tí Miguelo !!



## INDICE

<b>Agradecimientos Institucionales</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos Personales</b>	<b>iii</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>vi</b>
<b>Indice</b>	<b>1</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>4</b>
<b>Resumen</b>	<b>6</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>10</b>
La regionalización animal y especificación celular están gobernados por la actividad de los factores de transcripción	<b>11</b>
<i>Arabidopsis</i> como modelo experimental	<b>12</b>
El desarrollo floral como ejemplo de adquisición de identidad regional y el papel de los genes MADS-box	<b>15</b>
Modelo ABC del desarrollo floral	<b>17</b>
Regulación transcripcional por las proteínas MADS	<b>20</b>
Las cajas CArG, las proteínas MADS y sus los elementos regulatorios	<b>21</b>
La redundancia funcional en los genes MADS-box	<b>23</b>
Los genes blanco de las proteínas MADS	<b>25</b>
Los dímeros MADS y los complejos mayores	<b>26</b>
El desarrollo de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	<b>28</b>
Las hormonas vegetales y su relación con el desarrollo de la raíz	<b>32</b>
El papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz	<b>32</b>
Regulación del tamaño y mantenimiento del meristemo de la raíz	<b>35</b>
La transición a la floración, las vías de floración y su regulación:	<b>41</b>
La vía del Fotoperiodo	<b>43</b>
La vía Autónoma	<b>49</b>
La vía de las Giberelinas	<b>50</b>

La vía de la Vernalización y la regulación de <i>FLC</i>	52
<b>Antecedentes</b>	<b>57</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>59</b>
<b>Objetivos</b>	<b>59</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>59</b>
<b>Objetivos Específicos</b>	<b>59</b>
<b>Resultados</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo I. Patrones de expresión de genes MADS en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b>	<b>62</b>
<b>Publicación: Caroline Burgeff, Sarah J. Liljegren, Rosalinda Tapia-López, Martin F. Yanofsky, Elena R. Alvarez-Buylla. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordial, meristems and differentiated tissues of <i>Arabidopsis thaliana</i> roots. <i>Planta</i> <b>214</b>:365-372</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo II. El papel del gen <i>XAL1/AGL12</i> en el desarrollo de la raíz y la regulación de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>.</b>	<b>69</b>
<b>Publicación: Rosalinda Tapia-López, Berenice Gacía-Ponce, Joseph G. Dubrovsky, Adriana Garay-Arroyo, Rigoberto V. Pérez-Ruíz, Sun-Hyung Kim, Francisca Acevedo, Soraya Pelaz y Elena R. Alvarez-Buylla. (2008). An AGAMOUS-Related MADS-box gene, <i>XAL1 (AGL12)</i>, regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in <i>Arabidopsis</i>. <i>Plant Physiology</i> <b>146</b>:1182-1192.</b>	<b>70</b>
<b>Discusión</b>	<b>84</b>
<i>XAL1/AGL12</i> participa en la regulación de la proliferación celular y el patrón de desarrollo del meristemo de la raíz.	<b>86</b>
Relación de las auxinas y de <i>XAL1</i> en el floema de la raíz	<b>89</b>

Papel de <i>XAL1</i> en la transición a la floración	92
<b>Conclusiones y Perspectivas</b>	<b>94</b>
<i>Nuevos enfoques que podrían ayudar a entender la función de XAL1 y otros genes MADS-box</i>	97
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>99</b>
<b>APENDICE 1</b>	<b>130</b>
<b>S. Pelaz, R. Tapia-Lopez, E.R. Alvarez-Buylla, M.F. Yanofsky. (2001).</b> Conversion of leaves into petals in Arabidopsis. Current Biology 11:182-184.	<b>133</b>
<b>TABLA DE MOTIVOS DE PROMOTOR DE XAL1/AGL12</b>	<b>136</b>
<b>Resultados no incluidos en las publicaciones</b>	<b>139</b>

## Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
AG	AGAMOUS
AGL	AGAMOUS Like
ARF's	AUXIN RESPONSE FACTORS
AP1	APETALA 1
AP2	APETALA2
AP3	APETALLA 3
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARR1	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1
ARR12	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 12
Aux/IAA	AUXIN7INDOLE-3-ACETIC ACID
BRs	Brasinoesteroides
BRX	BREVIS RADIX
CAL	CAULIFLOWER
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CDF1	CYCLING DOF FACTOR 1
CKs	Citocininas
CLF	CURLY LEAF
CLV3	CLAVATA 3
CO	CONSTANS
Col	Columbia
COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC
CQ	Centro Quiescente
DEF	DEFICIENS
ELF3	EARLY FLOWERING 3
ELF4	EARLY FLOWERING 4
FD	FLOWERING LOCUS D
FKF1	FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT AND F-BOX 1
FLC	FLOWERING LOCUS C ()
FLK	FLOWERING LOCUS KH DOMAIN
FRI	FRIGIDA
FT	FLOWERING LOCUS T
FUL	FRUITFULL
GAs	Giberelinas
GI	GIGANTEA
GLO	GLOBOSA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de hidrógeno
JKD	JACKDAW
LD	LUMINIDEPENDENS
LHY	LATE ELOGATED HYPOCOTYL
LU	LUX ARRHYTHMO
MGP	MAGPIE

<i>MP</i>	<i>ARF5/MONOPTEROS</i>
mRNA	Ácido Ribonucléico mensajero
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Oxígeno
pb	pares de bases
<i>PI</i>	<i>PISTILLATA</i>
PRC2	Complejo Represor Polycomb 2
PLT	<i>PLETHORA</i>
PIN	PINFORMED
RAM	Root Apical Meristem
RGA	REPRESOR OF GAI-3
RGF	ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR
RNAslnc	RNAs largos no codificantes
ROS	Reactive Oxygen Species/Especies Reactivas de
Oxígeno <i>SHR</i>	<i>SHORT-ROOT</i>
SAM	Shoot Apical Meristem/ Meristemo apical del vástago
aéreo	
SER	Serum Response Element
<i>SCR</i>	<i>SCARECROW</i>
<i>SEP1</i>	<i>SEPALLATA1</i>
<i>SEP2</i>	<i>SEPALLATA2</i>
<i>SEP3</i>	<i>SEPALLATA3</i>
<i>SHP1</i>	<i>SHATTERPROOF 1</i>
<i>SHP2</i>	<i>SHATTERPROOF 2</i>
<i>SHY2</i>	<i>SHORT HYPOCOTYL 2</i>
<i>SOC1</i>	<i>SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF</i>
<i>CONSTANS1 SPA</i>	<i>SUPPRESSOR OF PHYA-105</i>
<i>SQUA</i>	<i>SQUAMOSA</i>
SRF	Serum Response Factor
<i>SVP</i>	<i>SHORT VEGETATIVE PHASE</i>
<i>TLF1</i>	<i>TERMINAL FLOWER1</i>
TMO7	TARGET OF MP 7
<i>TOC1</i>	<i>TIMMING OF CAB EXPRESSION1</i>
TPST	TYROYLPROTEIN SULFOTRANSFERASE
<i>TSF</i>	<i>TWIN SISTER OF FT</i>
<i>REF6</i>	RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6
RFI2	RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2
<i>UPB1</i>	<i>UPBEAT1</i>
<i>WOX5</i>	<i>WUS-REALTED HOMEBOX</i>
Wt	Wild type - Silvestre
WUS	WUSCHEL

## RESUMEN

Las proteínas MADS-box son factores de transcripción que participan en procesos de desarrollo tanto en los animales como en las plantas. Estos genes se encuentran mayormente representados en las plantas y se ha descrito que participan a lo largo del ciclo de vida de éstas, desde la embriogénesis hasta el desarrollo floral y de los frutos. El presente trabajo se centró en el estudio de los genes MADS-box *AGL12*, *AGL16*, *AGL17*, *AGL19* y *AGL21*, los cuales se encuentran involucrados en el desarrollo de las raíces, así como en la transición a la floración en *Arabidopsis thaliana*. La presente tesis contiene dos contribuciones relacionadas con la función de los genes MADS-BOX en la raíz.

En la primera contribución (Burgeff *et al.*, 2002) presentó la caracterización de los patrones de expresión *in situ* de los genes MADS-box *AGL12*, *AGL16*, *AGL17*, *AGL19* y *AGL21* en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Además se establecieron sus relaciones filogenéticas y sus posibles funciones con base en sus patrones de expresión.

La segunda contribución (Tapia-López *et al.*, 2008) constituye la parte medular de mi tesis, centrada en el estudio del gen *AGL12/XAL1*, un gen hermano del clado de *AGAMOUS*, el cual caracterizamos funcionalmente, mediante genética-reversa. El análisis del fenotipo de los alelos plantas mutantes de *xal1* mostró que presentaron raíces más cortas, debido a una reducción en el tamaño del meristemo, una baja producción celular, un ciclo celular más largo y una organización atípica del meristemo apical de la raíz, en comparación con la raíces de una planta silvestre. A partir de líneas con construcciones reporteras (*XAL1::β-glucuronidasa*) se corroboró la expresión de *XAANTAL1* en el floema de las raíces y la inducción de este gen en la raíz por la adición de auxinas. Un resultado muy interesante en esta publicación con respecto a la función de este gen en otros órganos de la planta, fue que *XAL1* se expresó también en el meristemo floral y en los nectarios. Debido a que los alelos mutantes de *xal1* mostraron un retraso en el tiempo de floración en día largo se analizaron patrones de expresión de diferentes genes involucrados en las diferentes vías de la floración. Por los patrones de

expresión y fenotipo aéreo proponemos que *XAL1* participa en la vía del fotoperiodo y que es un regulador corriente arriba de los genes *SOC1*, *FLT* y *LFY*, integradores de las diferentes vías de inducción a la transición floral.

Finalmente y aunque no constituye el trabajo principal de mi tesis, se incluyó en el apéndice 1 una publicación más derivada de mi trabajo durante el doctorado. En el artículo de Pelaz *et al.*, 2001, en el que demostramos la participación e interacción de los genes MADS-box *SEPALLATA 2* y *3* con los genes con genes del modelo ABC del desarrollo floral. Los genes *SEP* (hasta entonces desconocidos) son indispensables para la especificación de los órganos florales, ya que la pérdida de su actividad en conjunto dio como resultado “flores” en las que todos los órganos florales eran sustituidos por estructuras semejantes a hojas. En este trabajo utilizamos líneas de sobre-expresión de los genes *SEP 2* y *3*, junto con los genes de las funciones A y B, y demostramos que esto era suficientes para convertir las hojas en pétalos, por lo cual se incluyó en el modelo a los genes *SEP*, como la los responsables de la función E.

## ABSTRACT

MADS-box proteins are transcription factors involved in development processes, both in animals and plants. These genes are mainly represented in plants, and they have been shown to act throughout the plants life cycle, starting from embryogenesis and up to flower and fruit development. The present work is focused on MADS-box genes *AGL12*, *AGL16*, *AGL17*, *AGL19* and *AGL21*, which are involved in root development, and flowering transition of *Arabidopsis thaliana*. The present thesis contains two contributions on the function of MADS-BOX genes in the root and flowering time.

The first contribution (Burgeff *et al.*, 2002) comprehends *in situ* gene expression characterization of MADS-box genes *AGL12*, *AGL16*, *AGL17*, *AGL19*, and *AGL21* in *A. thaliana* roots. Furthermore, we established their phylogenetic relationships and possible functions based on its expression patterns.

The second contribution (Tapia-López *et al.*, 2008) is the core of my thesis, focusing in the study of the gene *AGL12/XAL1*, a sister gene of the AGAMOUS clade, of which we characterized its functionality by using reverse-genetics. Phenotypic analysis of *xal1* mutant plant alleles showed they presented shorter roots, due to a reduction in meristem size, lower cell production, longer cell cycle, and atypical organization of the root's apical meristem, compared to wild plants roots. Using lines with reporter constructions (*XAL1::β-glucuronidase*) we corroborated the expression of *XAANTAL1* in the root's phloem, and its induction in the root by addition of auxins. An interesting result related to this gene's function in other plant structures, is that *XAL1* also expressed in the floral meristem and the nectaries. Because the mutant alleles of *xal1* promoted a delay of flowering in long days, we analyzed the expression patterns of different genes involved in different flowering pathways. The expression patterns and aerial phenotype make us consider that *XAL1* participates in the photoperiod pathway, and that it is an up-



way regulator of genes *SOC1*, *FLT* and *LFY*, which are integrators of the various induction pathways to floral transition.

Finally, notwithstanding it is not the main subject of my thesis, I included one more publication derived from my doctoral work in the Appendix 1. It is in the article by Pelaz *et al* (2001) that we show the participation and interaction of *MADS-box* genes *SEPALLATA 2* and *3* with the genes of the ABC model of floral development. The genes *SEP* (unknown until now) are necessary for the specification of flower organs. The loss of their joint activity resulted in “flowers” of which all organs were substituted by leaf-like structures. In this work we used over-expression lines of *SEP 2* and *3* genes, along with the A and B function genes, and we demonstrated that these were enough to convert leaves into petals. Accordingly the *SEP* genes were included in the ABC model, as responsible of the E function.

## **INTRODUCCIÓN**

La gran riqueza en la diversidad biológica que actualmente conocemos, es el resultado de más de  $1 \times 10^{12}$  años de evolución desde que surgió la multicelularidad de manera independiente en plantas y animales a partir de diferentes ancestros unicelulares. Estos organismos unicelulares, a su vez, derivaron de un ancestro común, probablemente semejante a un eucarionte que poseía mitocondrias y un metabolismo aeróbico. Sin embargo, es necesario enfatizar que un organismo complejo o multicelular es más que sólo la suma de células ensambladas azarosamente después de consecutivas divisiones celulares. Y aunque cada una de las células que conforman a este organismo lleva la misma información genética, sólo un grupo de esas células se activará en un momento determinado, en respuesta a determinados estímulos internos o ambientales. Durante el desarrollo de un embrión se lleva a cabo una regionalización, en donde las células se diferencian y se subdividen para finalmente adoptar un determinado destino celular, formando tejidos y órganos con formas específicas en un proceso conocido como morfogénesis. El proceso de regulación génica y re-arreglos espaciales durante esta regionalización y especificación es denominado “formación de patrones” (Wieschaus, *et al*, 1984). ¿Cómo se determina y regula la formación de estos patrones en un organismo multicelular en crecimiento? es una de las preguntas centrales de la Biología del Desarrollo. Entre los mecanismos implicados en la formación de patrones está la distribución asimétrica de moléculas de señalización y las finas e intrincadas redes de interacciones entre las moléculas regulatorias. La asimetría de los campos morfogenéticos provee de información posición-específica, la cual es subsecuentemente traducida en la activación diferencial de los factores de transcripción (Gönczy y Rose, 2005; Fleet y Tai-Ping 2005).

## ***La regionalización animal y la especificación celular están gobernados por la actividad de los factores de transcripción***

En los metazoa se han descrito diversas mutantes que tienen defectos en la regionalización celular (Mann y Morata , 2000; Schneider-Maunoury y Pujades 2007). El análisis de dichas mutantes ha puesto de manifiesto que las principales moléculas responsables que definen cada región en el embrión son los factores de transcripción. Un paradigma para la regulación de la identidad de cada región es el código combinatorio de la actividad de un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas, las proteínas homeóticas codificadas por los genes HOMEODOMAIN (Wolpert, 1998; Purugganan, 1999). En el caso de *Drosophila*, los embriones están divididos a lo largo de un eje antero-posterior en regiones llamadas parasegmentos, los cuales se forman a partir de variaciones de una misma unidad básica de construcción (el metámero). La identidad final de un parasegmento está definida por la expresión de diferentes combinaciones de genes homeóticos (Mannervik, 1999). La ganancia o pérdida de función de uno sólo de éstos genes homeóticos no resulta en la pérdida o ganancia de parasegmentos, pero sí en la producción de cambios en el código combinatorio y como consecuencia final el cambio de identidad en los parasegmentos, “las conversiones homeóticas”. Este código combinatorio funciona de manera similar en otros sistemas animales en los que se da la formación de metámeros, como en las somitas de los mamíferos. En el embrión de *Chaenorabditis elegans* hay división en unidades básicas de construcción y las regiones embrionarias tempranas no están definidas por un código combinatorio como el anteriormente descrito en *Drosophila* (Gönczy y Rose, 2005). Sin embargo, de manera similar como en *Drosophila*, la regionalización se debe a la actividad diferencial de los factores de transcripción (Rose y Kempfues, 1998).

Es interesante preguntarnos, ¿Cómo se establecen estas regiones en cada organismo?, ¿Cómo se inicia la actividad diferencial o combinatoria de los factores de transcripción?. Las posibles respuestas son tantas como clases de animales y

plantas existen, y se han descrito muchos tipos de mecanismos diferentes para la regionalización y asimetría temprana (Rose y Kemphues, 1998; Beddington y Robertson, 1999; Coen y Meyerowitz, 1991). La integración de las señales que dividen al embrión en regiones provee claves para iniciar el proceso de especificación del tipo celular. Un ejemplo bien documentado es la diferenciación del músculo esquelético. (Megeny y Rudnicki, 1995; Molkenin y Olson, 1996).

En general, los estudios en animales han demostrado que tanto la regionalización temprana en el embrión, como la división celular asimétrica, la polaridad celular, la especificación y la diferenciación celular son procesos que están basados en la actividad diferencial de diferentes familias de proteínas involucradas en la señalización y morfogénesis tales como las proteínas G, GTPasas Rho y las proteínas PAR y en el establecimiento de gradientes de las mismas (Goldstein y Macara, 2007; Li, 2013). La comunicación diferencial célula-célula a menudo vía interacciones receptor-ligando constituye otro de los mecanismos más estudiados en los procesos de diferenciación animal (Shilo *et al.*, 2013). El desarrollo del plan corporal animal es controlado por mecanismos complejos que incluyen también la acción de diversos microRNA (Ambros, 2004).

### ***Arabidopsis como modelo experimental***

Durante los últimos 30 años, *Arabidopsis thaliana* ha sido adoptada como uno de los organismos modelo emblemático de las plantas. El género *Arabidopsis* pertenece a la tribu Sisymbriae, un miembro de la familia de las Brassicaceae (mostazas o crucíferas y contiene aproximadamente 10 spp que son nativas de Eurasia, África del Norte y Norteamérica. Estas especies incluyen a *Arabidopsis*, siendo *A. thaliana* (L) Heynb  $2n=10$ , el miembro mejor conocido y uno de los más extensivamente utilizados en la investigación (Anderson y Wilson, 2000; Weigel y Mott, 2009; TAIR [<http://www.arabidopsis.org>]). Con esta pequeña Brassicaceae se han desarrollado importantes herramientas experimentales, genéticas, moleculares e inclusive genómicas y transcriptómicas que han facilitado

el desarrollo de diferentes áreas de estudio de la biología de las plantas (Nordborg y Weigel, 2008; Ossowski, *et al.*, 2008; Wienkoop, *et al.*, 2010; 1001 genomes.org). Gran parte del éxito en su estudio consiste en que es una planta pequeña, fácil de manejar en el laboratorio. *Arabidopsis* tiene un ciclo de vida corto, que puede durar entre 6-8 semanas (Figura 1). Es autógama por lo que produce un número grande de descendientes por generación. Las semillas se producen en los frutos o silicuas, y cada silicua puede generar aproximadamente 50 semillas. Como no es una planta estacional, se pueden producir varias generaciones a lo largo del año, lo cual facilita la relativa rapidez de los análisis genéticos. (Meyerowitz, 1989; Kornneff y Meinke, 2010).

Otro punto a favor de *Arabidopsis* en comparación con otras angiospermas, es que tiene un genoma relativamente pequeño secuenciado desde hace más de 10 años de aproximadamente 100-120 megabases, ya que contiene poco DNA repetitivo (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Sommerville y Koornneef, 2002). Comparativamente el tamaño del genoma haploides de otras angiospermas es mayor como el tabaco y el chícharo son de aproximadamente  $1.6 \times 10^9$  pb y  $4.5 \times 10^9$  pb, respectivamente. El tamaño del genoma de *Arabidopsis* es tan sólo 15 veces mayor al de *Escherichia coli*, y ocho veces mayor que el de *Saccharomyces cerevisiae* (Meyerowitz, 1989). Se ha reportado que aproximadamente el 60% del DNA nuclear de *Arabidopsis* tiene una función y tiene alrededor de 20,000 secuencias codificadoras. Es un organismo diploide y su genoma se encuentra organizado en 5 cromosomas, mientras que otros modelos experimentales como el maíz y otros cultivos importantes son poliploides. Por lo que la identificación de características recesivas es más directa y sin complicaciones de efectos de genes dosis dependientes (Weigel y Mott, 2009).



**Figura 1. *Arabidopsis thaliana* y su ciclo de vida.** *A. thaliana* crece vegetativamente como una pequeña roseta de aproximadamente 2-5 cm de diámetro (dependiendo del ecotipo), de la cual se produce un tallo floral, que puede alcanzar una altura de entre 20-70 cm. En la parte superior derecha, se muestra su flor la cual tiene una estructura típica de las crucíferas. Las flores miden aproximadamente de 3-5 mm de largo y 1-3 mm de ancho, y se producen a intervalos como parte de una inflorescencia. Los frutos o silicuas que se observan a lo largo del tallo floral pueden contener hasta 50 semillas (Anderson y Wilson, 2000; Somerville y Koornneef, 2002; Rhee *et al.*, 2003). Los ecotipos más utilizados con Landsberg erecta, Columbia, C24, y Wasilekjskia entre otros (Koornneef y Meinke, 2010).

En el laboratorio se puede transformar genéticamente de forma fácil y rutinaria a través de la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*, y con la utilización de plásmidos recombinantes de interés (Clough y Bent, 1998). El mantenimiento de líneas homocigotas es relativamente sencillo por su alta producción de semillas, lo que la hace un sujeto ideal para experimentos de mutagénesis (Marsch-Martínez, *et al.*, 2002). Además se cuenta con una gran cantidad de mutantes y líneas transgénicas facilitando el estudio de aspectos del metabolismo, crecimiento y desarrollo en esta planta (Estelle y Somerville, 1986; Aarts *et al.*, 1993).

## ***El desarrollo floral como ejemplo de adquisición de identidad regional y el papel de los genes MADS-box***

El desarrollo de una planta depende de un gran número de factores que interactúan en cada una de las diferentes etapas o estadios durante el ciclo de vida, y dentro de estos factores se encuentra la familia multigénica de los genes MADS-box (Schwarz-Sommer et al. 1990). Los genes MADS-box codifican para una familia de factores de transcripción presentes en casi todos eucariontes que se encuentran involucrados en diversas e importantes funciones biológicas (Shore y Sharrocks, 1995; Messenguy y Dubois, 2003). Este grupo de genes se ha encontrado en levaduras, insectos, nemátodos, animales y plantas, sugiriendo que éste grupo de genes pudieran tener un ancestro común que apareció al menos hace 1000 millones de años (Alvarez-Buylla et al., 2001; Alvarez-Buylla et al., 2010). Los genes de esta familia contienen un dominio de unión a DNA de aproximadamente 180 pb altamente conservado denominado caja MADS ubicado en el extremo amino terminal y que se asocia al DNA, en regiones específicas de otros genes (Shore y Sharrocks, 1995). La caja o dominio K medianamente conservado codifica para un polipeptido de unos 70 aminoácidos, su estructura es similar al motivo de las hélices anfipáticas “*coiled-coil*” o trenza anudada de la queratina (*Keratin* en inglés, de ahí su nombre) la cual lleva a cabo interacción con otras proteínas. Las cajas MADS y K están separadas por una región intermedia I (*Intervening*), altamente variable, el cual se encuentra involucrada en la dimerización de proteínas. Finalmente el dominio carboxilo-terminal es el menos conservado que participa también en la dimerización entre diferentes proteínas, principalmente de tipo MADS-box (Figura 2A). (Shore y Sharrocks, 1995; Riechman y Meyerowitz, 1997; Yanofsky et al., 1999).

En nombre MADS es un acrónimo de los miembros de esta familia originalmente descritos: la proteína **M**inichromosome **M**aintenance 1 de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína **A**GAMOUS de *Arabidopsis thaliana*, la

proteína **DEFICIENS** de *Antirrhinum majus*, y la proteína humana **SERUM RESPONSE FACTOR** (Shore y Sharrocks, 1995 : Thiessen *et al.*, 1996).

El número genes MADS-box encontrados en los diferentes taxa es diferente, pero la mayor representación se encuentra en plantas. Por ejemplo, en el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han reportado cuatro genes de esta familia Mcm1, Arg80, Rlm1 y Spm1. Mcm1 y Arg80 están involucradas en el control del metabolismo de arginina (Messenguy y Dubois, 2000). Mientras que Rlm1 controla la expresión de genes requeridos para la integridad de la pared celular, y Spm1 participa en la respuesta al stress osmótico mediada por la vía de transducción de señales de Hog1 (Watanabe *et al.*, 1995; Nadal Ed *et al.*, 2003). En el caso de animales, SRF funciona mediando la transcripción de genes inmediatamente tempranos tales como *c-fos*, *b actina* y *junB* entre otros. Además de regular a genes específicos de músculo expresados en células postmitóticas a través de la interacción de factores de transcripción biogénicos tales como MyoD-E12, Nkx2-5 o GATA 4 entre otros (Messenguy y Dubois 2003). Estos genes SRF se han encontrado en humanos, insectos, ratas, pollos, y sapos entre otros (Minty y Kedes, 1986; Shore y Sharrocks, 1995; Messenguy y Dubois 2003).

En plantas existen muchas familias de factores de transcripción y varias de éstas pueden contener más de 100 miembros como en el caso de la familia MADS-box (Riechmann y Ratcliffe, 2000). Los integrantes de la familia MADS-box en plantas juegan diversos papeles en un amplio rango de procesos del desarrollo, e.g. la transición floral, el desarrollo de órganos florales y de la raíz, y de la formación de frutos entre otros (Mandel *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993; Goto y Meyerowitz, 1994; Rounsley *et al.*, 1995; Zhang y Forde, 1998; Michaels y Amasino, 1999; Hartman *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000; Thiessen *et al.*, 2000; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000a; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000b; Ferrandiz *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2000; Ng, y Yanofsky, 2001; García Maroto, *et al.*, 2003; Burgeff *et al.*, 2002; Michaels *et al.*, 2003).



## ***El Modelo ABC del desarrollo floral***

El desarrollo de la flor es un proceso complejo y en *Arabidopsis* se ha dividido en 12 estadios iniciando por el meristemo floral y terminando en la antesis (Smyth *et al.*, 1990). Las flores perfectas contienen cuatro regiones concéntricas, los verticilos, con diferentes órganos cada una. De afuera hacia adentro hay cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y dos carpelos fusionados (Figura 1). Los estadios 1 y 2 representan la iniciación y el crecimiento respectivamente del meristemo floral. De los estadios 3 al 5, el meristemo floral da lugar a los diferentes primordios de los órganos que se desarrollarán en los cuatro órganos florales durante los estadios 6 al 9. En los estadios 9 al 12, los órganos florales se expanden y la diferenciación celular ocurre. A partir del estadio 12 se lleva a cabo la antesis y el fruto comienza a desarrollarse (Smyth *et al.*, 1990; Alvarez-Buylla *et al.*, 2010).

Para definir como se determinan las estructuras de una flor se utilizó un enfoque genético en *Arabidopsis thaliana* y *Antirrhinum majus* principalmente (Coen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994). Estos estudios permitieron la construcción de un modelo combinatorio simple y elegante para explicar cómo la acción de un pequeño grupo de genes actuando de manera conjunta, especificaban la identidad de los cuatro órganos florales. A este modelo se le llamó “el modelo ABC”, y fue propuesto a principios de los años 90, basado en el estudio de una serie de mutantes homeóticas que presentaban órganos “correctamente” formados pero con identidades de posición incorrectas dentro de la flor (Coen y Meyerowitz, 1991; Weigel y Meyerowitz, 1994). Para el diseño de este modelo también se tomaron en cuenta los patrones de expresión de los genes responsables de los fenotipos afectados en las mutantes homeóticas (Bowman y Smith, 1989; Yanofsky *et al.*, 1990; Kempin *et al.*, 1995). Los genes involucrados en el destino de los cuatro verticilos se denominan genes de identidad de órgano, los cuales casi todos, a excepción de *APETALA2* (*AP2*), son

codificados por los factores de transcripción MADS-box (Coen y Meyerowitz, 1991).

Como se mencionó anteriormente, el modelo ABC ha constituido una elegante y simple forma de explicar la base regulatoria-molecular de la formación de las flores en angiospermas e inclusive en algunas gimnospermas (Bowman *et al.*, 1991; Melzer *et al.*, 2010). Este modelo predice la existencia de al menos tres funciones genéticas que regulan la posición de los verticilos florales, las funciones A, B y C (Figura 2B). La actividad A determina la diferenciación de los sépalos (verticilo 1); la combinación de las actividades A y B establece la identidad de los pétalos (verticilo 2); la actividad conjunta de B y C determina la actividad de los estambres (verticilo 3), y la actividad C por sí sola da lugar a la formación de carpelos (verticilo 4) Figura 2B. Además, se establece que las actividades tienen dominios espaciales de acción, las actividades A y C son mutuamente excluyentes, garantizando que A se exprese sólo en los verticilos 1 y 2; y C sólo en los verticilos 3 y 4. Al estar ausente cualquiera de estas dos actividades A o C, la otra se extiende al resto de la flor. La actividad B se autorregula, a través de sus elementos constituyentes. Según el modelo la función “A” esta mediada por los genes *APETALA 1 (AP1)*, *CAULIFLOWER (CAL)*, y *AP2*, la función “B” esta representada por los genes *APETALLA 3 (AP3)* y *PISTILLATA (PI)* y para la función “C” se requiere del gen *AGAMOUS (AG)* (Bowman *et al.*, 1991; Bowman, *et al.*, 1993; Weigel y Meyerowitz, 1994; Reichman y Meyerowitz, 1997).

Posterior a la publicación del modelo ABC se encontró un grupo más de genes MADS-box relacionados con las estructuras florales. Se trata de otros tres genes redundantes y estrechamente relacionados, los genes *SEPALLATA1/2/3 (SEP1/1/2/3)*, que presentan similitud en secuencia y en sus patrones de expresión (Flanagan y Ma, 1994; Jack, 2001; y Pelaz *et al.* 2001b). Las mutantes sencillas en cada uno de éstos genes no mostraron fenotipo, sin embargo, los

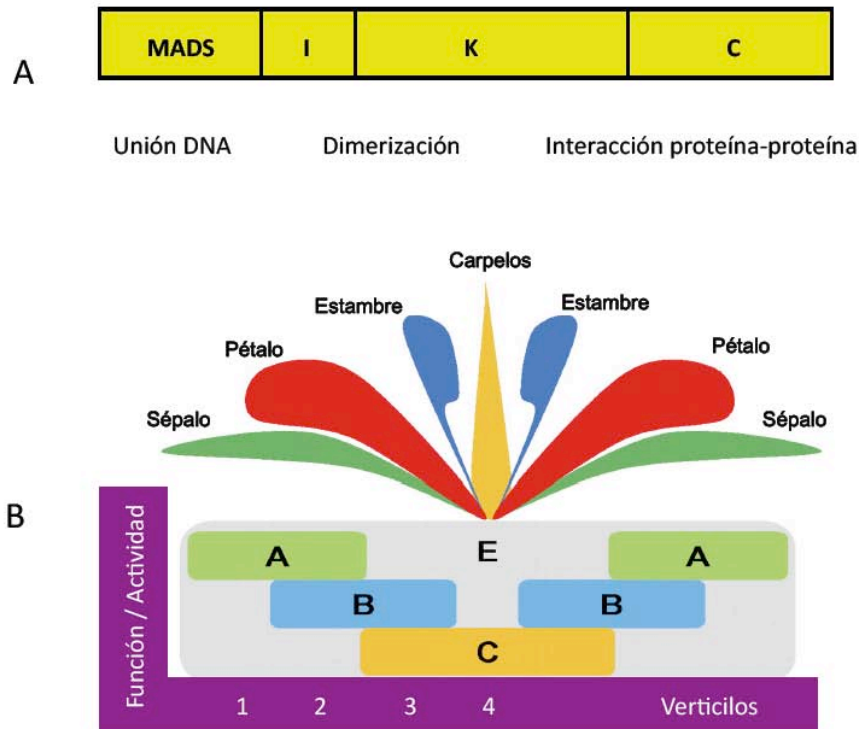


Figura 2. Representación de un gen MADS box y el modelo ABC de desarrollo floral. A) Modelo de un gen MADS-box tipo II MIKC formado por varios dominios o módulos. El dominio MADS, el dominio I, el dominio K y el dominio C-terminal. B) Modelo ABC del desarrollo floral, en éste se incluyen las actividades o funciones genéticas A, B, C y E, así su relación funcional con cada verticilo floral. Los sépalos corresponden al verticilo 1, los pétalos al verticilo 2, los estambres al verticilo 3 y los carpelos al verticilo 4. En la parte inferior se ve el modelo donde se representan las diferentes funciones A, B, C, y E, y los cuatro verticilos florales.

verticilos internos de las mutantes triples *sep1/sep2/sep3* presentaron órganos parecidos a sépalos, fenotipos semejantes a los producidos en las mutantes de los genes B y C, (Jack, 2001; Honma y Goto 2001). Se encontró que la función de los genes *SEP* se encuentra relacionada con los dominios de las funciones B y C (Chen y Meyerowitz, 1999; Pelaz *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2001a; Honma *et al.*, 2001). Al ponerse de manifiesto la importancia de los genes *SEPALLATA* en la especificación de la identidad de

los órganos florales, se propuso una modificación al modelo “ABC”, integrándose la función E representada por estos genes (Thiessen, 2001) (Figura 2B). El artículo que presento en el apéndice 1 en esta tesis doctoral fué fundamental para entender la función de este último grupo de genes (Pelaz *et al.*, 2001).

Este parte-aguas en el entendimiento del desarrollo floral ha llevado a la realización de una cantidad de experimentos posteriores que ayudaron a entender que la regulación de la identidad de órganos florales es mucho más compleja de lo inicialmente propuesta (Espinosa-Soto, *et al.*, 2004). Además, a nivel molecular, las proteínas codificadas por los genes MADS-box son activas cuando actúan de manera conjunta y la aplicación universal del modelo puede tener modificaciones según el grupo de plantas estudiado, tal es el caso de monocotiledóneas y algunas angiospermas basales (Egea-Cortines y Davies, 1999, Causier *et al.* 2010; Soltis *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2003; Messenguy y Dubois, 2003; Adamczyk y Fernandez, 2009).

### ***Regulación transcripcional por las proteínas MADS***

La regulación de la transcripción es un mecanismo mayor que controla la actividad genética en los sistemas biológicos complejos. Un paso clave en esta regulación es la unión secuencia-específica de los factores de transcripción (o elementos *trans*) a sus sitios de reconocimiento al DNA (los elementos *cis*). Además de las interacciones *cis-trans*, la expresión temporal y espacial de los factores de transcripción son parte de los mecanismos de control de los patrones de expresión de los genes blanco localizados corriente abajo (Sablowsky y Meyerowitz, 1998). Resulta fascinante entender como factores de transcripción con propiedades de unión al DNA similares pueden controlar procesos biológicos tan diversos (Duarte *et al.*, 2006). Otro importante factor recientemente descrito que influencia la regulación transcripcional es el empaquetamiento del DNA o estado de la cromatina, lo cual limita la accesibilidad

del sitio de unión del DNA a ciertas proteínas. En este caso la regulación es a nivel epigenético (He *et al.*, 2011; Bannister y Kouzarik, 2011).

### ***Las cajas CArG, las proteínas MADS y sus los elementos regulatorios***

Los sitios de unión de los factores de transcripción MADS-box se reportaron inicialmente en regiones corriente-arriba del gen de actina cardiaca humana y parecen estar evolutivamente conservadas entre humanos, ratón, pollo, rata y sapo (Minty y Kedes, 1986). Estos motivos comunes en el DNA muestran una diada simétrica de CC(AT)6GG muy conservada (denominada caja CArG) (Shore y Sharrocks, 1995; Riechman y Meyerowitz 1997). En humanos se encontró un motivo de unión al DNA similar en el gen c-fos, el cual mostró una actividad transcripcional “*serum-inducible*” dependiente del Elemento de Respuesta Sérica SRE (Serum Response Element) (Treisman, 1986). El Factor de Respuesta Sérica (Serum Response Factor-SRF) se une a uno de los miembros fundadores de la familia MADS-box al elemento SRE (Norman *et al* 1988 ; Schwartz-Sommer, 1990). Diferentes análisis mostraron que la caja CArG, y el elemento SER son funcionalmente intercambiables y que el SRF se une a la caja CArG *in vitro* (Norman *et al* 1988; Pollock y Treisman, 1990).

A principios de los 90’s se demostró en *Antirrhinum* por ensayos de retardamiento en gel que los genes de *DEF* y *GLOBOSA (GLO)* que a semejanza de animales y hongos, las proteínas MADS de plantas se unen a secuencias consenso semejantes a las cajas CArG (Mueller y Nordheim, 1991; Schwarz-Sommer, *et al.*,1992). Desde entonces, se han desarrollado varios métodos para identificar estas cajas o motivos CArG. Específicamente en AG, se han identificado los sitios de unión utilizando un “pool” de oligonucleotidos al azar y por ensayos de unión *in vitro* para el dominio MADS (Riechman, *et al.*, 1996). El dominio CArG también se identificó en *AP1*, y en las proteínas tipo “B” *AP3* y *PI*, *FLC*, *SOC1* y *FT* en *Arabidopsis* (Helliwell *et al.*, 2006) y *DEF*, *GLO* y *PLENA (PLE)* en *Antrirrhinum* (West *et al.*, 1998). Todos estos estudios *in vitro* demostraron que las proteínas

MADS de plantas se unen a la caja CArG con una secuencia básica CC(AT)6GG, en la cual existe cierta flexibilidad a variaciones en la misma secuencia y en los nucleótidos contiguos. Dependiendo del gen estudiado, los nucleótidos flanqueantes también parecen contribuir al reconocimiento del sitio de unión, dando especificidad de unión a los miembros de esta familia MADS en plantas (Riechman, *et al.*, 1996; de Folter *et al.*, 2005).

Por ejemplo, en el caso de levaduras, la proteína de Mantenimiento del Minicromosoma 1 (MCM1) tiene muy alta homología al SRF. La proteína MCM1 está involucrada en la respuesta a feromonas y en la determinación del tipo celular (Shore y Sharrocks, 1995; Mesenguy y Dubois, 2003). El sitio de unión a MCM1, el cual es similar a SER y a la CArG box, es llamado Elemento de Control de MCM1 (Passmore, *et al.*, 1989).

A la fecha, se han identificado más de 100 miembros de la familia MADS-box en *Arabidopsis* (Parenicová, *et al.*, 2003; Martínez Castilla y Álvarez-Buylla 2003; Kofuji, *et al.*, 2003; De bodt., *et al.*, 2003). No obstante, a pesar de que todos estos factores contienen un dominio de unión al DNA altamente conservado, y que probablemente reconocen una secuencia similar al motivo CArG box, sus genes blanco son distintos. Además es importante señalar que el mismo gen blanco puede ser regulado por diferentes proteínas MADS-box (Moon *et al.*, 2003; de Folter *et al.*, 2005). Entonces, ¿qué determina entonces la especificidad de reconocimiento?. La respuesta parece estar dada por los elementos *cis* o en los reguladores *en trans* y por los diferentes complejos proteicos en los que participan las proteínas MADS-box. Se han reportado recientemente algunos de los genes blanco sobre los que actúan algunas de las proteínas MADS-box en plantas (Sablowski y Meyerowitz, 1998; Wang *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2004; Gómez Mena *et al.*, 2005; Zhu y Perry, 2005). Esta información combinada con el conocimiento de las proteínas que forman los dímeros, abre nuevas vías de investigación para la unión DNA-proteína y pueden llevar a nuevos conceptos para las redes regulatorias de la transcripción.

## ***La redundancia funcional en los genes MADS-box***

La duplicación de genes ha constituido una importante fuente de novedades evolutivas que puede originarse a partir de duplicaciones a menor o mayor escala. Los proyectos de secuenciación de genomas completos han provisto de inventarios completos de familias genéticas que han permitido estudiar y entender mejor estos procesos. En el caso de las plantas (incluyendo *Arabidopsis* y el álamo), se ha reportado varias duplicaciones del genoma completo (Cui *et al.*, 2006; Maere *et al.*, 2005). Un evento de duplicación génica en su forma más simple produce dos genes parálogos redundantes (Simillion *et al.*, 2001; Rijpkema *et al.*, 2007). Después de una duplicación génica pueden presentarse los siguientes escenarios: 1) un gen parálogo llega a convertirse en un pseudogen; (2) los dos genes parálogos pueden divergir funcionalmente (neofuncionalización); (3) las dos copias mantienen solo una parte de sus funciones originales y juntas mantienen la capacidad total del gen ancestral (subfuncionalización), o (4) ambas copias mantienen completas las funciones originales haciendo que el organismo en cuestión sea más robusto a mutaciones en cualquiera de los ortólogos (Simillion *et al.*, 2002; Alvarez-Buylla *et al.*, 2006). La redundancia funcional es el resultado de uno de los eventos de duplicación génica, que generalmente puede estar seguida por la pérdida o conversión a pseudogen de una de las copias, mientras que la otra puede adquirir una nueva función (Lynch y Force, 2000; Lynch *et al.*, 2001; Walsh *et al.* 2003).

Un fenómeno frecuentemente observado durante la evolución de las grandes familias de factores de transcripción es la redundancia funcional. Durante la evolución, los genes duplicados y sus copias retenidas sobrelapan su función y generalmente comparten una alta similitud en sus secuencias, y algunos de éstos presentan sobrelapamiento en sus patrones de expresión (Gu *et al.*, 2003). El caso de la familia multigénica MADS-box, es un claro ejemplo de redundancia funcional. Muchas mutantes con pérdida de función en varios de estos genes, no presentan un fenotipo evidente (Moore y Purughannan, 2005) poniendo de

manifiesto la importancia de la redundancia funcional en esta familia multigenica y sugiriendo que juega un papel muy importante en la evolución y desarrollo de los organismos eucariontes. (Winzeler *et al.*, 1999; Vision *et al.*, 2000 ; Giaver *et al.*, 2002; Kamath *et al.*, 2003; Simmer *et al.*, 2003). Los genes MADS-box redundantes o duplicados actúan en todos los estadios durante el desarrollo de la planta y existen diversos ejemplos bien documentados floral, que involucran a los meristemas de identidad floral, genes de identidad de órgano, maduración de frutos, liberación de las semillas, y desarrollo de raíces entre otros (Kemping *et al.*, 1995; Ferrandiz *et al.*, 2000; Liljegren *et al.*, 2000a; Pelaz *et al.* 2000; Burgeff *et al.*, 2002; Pinyopich *et al.*, 2003; Vandenbussche, *et al.*, 2004; Soltis *et al.*, 2007).

Un caso ampliamente revisado sobre redundancia funcional en esta familia, lo constituyen los genes MADS-box *AP1*, *CAL* y *FUL* (*FRUITFULL*). Estos genes son redundantes en la especificación de los meristemas florales, y divergentes en su función en estados posteriores del desarrollo del meristemo floral y no revelan patrones de expresión sobrelapados en el desarrollo del fruto. Las mutantes sencillas de éstos genes no presentan fenotipo (Ferrandiz, *et al.*, 2000b; Álvarez-Buylla *et al.*, 2006).

Otro ejemplo son los genes *AGL30*, *AGL66* y *AGL104* involucrados en el desarrollo y maduración de polen, los cuales presentan funciones redundantes. Las dobles mutantes producen polen pero con una fertilidad severamente reducida debido a que tienen efectos en la viabilidad, una germinación retrasada y desarrollo aberrante del tubo de crecimiento (Adamczyk y Fernandez, 2009). Estudios de interacción proteína-proteína mostraron la formación de al menos tres heterodimeros entre estos genes (*AGL30-AGL104*, *AGL65-AGL104* y *AGL30-AGL66*), los cuales pueden tener funciones parcialmente redundantes. (Adamczyk y Fernandez, 2009).

Una consecuencia de la redundancia entre genes parálogos es que pueden presentar el mismo patrón de expresión en tejidos u órganos en donde sus



funciones se sobrelapan. Tal es el caso de los genes de *SHP1/SHP2*, en el que se observo solo fenotipo en el fruto en mutantes dobles de éstos genes. La mutante *shp1/shp2* presenta defectos en la zona de dehiscencia del fruto por la falla en la apertura de las valvas y por consiguiente en la liberación de las semillas (Liljegren, *et al.*, 2000).

Además, como mencionamos anteriormente, otro caso muy interesante sobre redundancia funcional, lo constituyen los tres genes *SEP* (*SEP1/SEP2/SEP3*). una triple mutante *sep1/sep2/sep3* mostro la pérdida de identidad de pétalos, estambres y carpelos y la transformación de éstos órganos en sépalos (Pelaz *et al.*, 2000; Pelaz *et al.*, 2001; Honma y Goto., 2001).

### **Los genes blanco de las proteínas MADS**

Se han diseñado diferentes estrategias para identificar a los genes blanco de los genes MADS-box, tales como experimentos de genética, escrutinios de “*differential display*”, doble y triple híbrido, ensayos de microarreglos, o experimentos de ChIP de inmunoprecipitación de cromatina (Taverner *et al.*, 2004; Wellmert *et al.*, 2004; Wellmert *et al.*, 2006; Kaufmann *et al.*, 2009; Immink *et al.*, 2010). Con algunas de estas estrategias se han identificado a los genes blancos directos, así como también a genes que participan en la cascada de señalización una vez activado el gen blanco.

Los primeros genes blanco de las proteínas MADS de plantas identificados resultaron ser los propios genes MADS. Las proteínas tipo B de *Antirrhinum* DEF y GLO se unen a sus propios promotores (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Tröbner *et al.*, 1992; Zachgo *et al.*, 1995). Estos “loops” o asas de autorregulación mantienen la expresión de *DEF* y *GLO* en pétalos y estambres después de la inducción inicial. Un sistema de retroalimentación similar fue detectado con los genes tipo B *AP3* y *PI* de *Arabidopsis* (Gómez Mena *et al.*, 2005; Jack *et al.*, 1994; Goto y

Meyerowitz, 1994; Honma y Goto, 2000; Chen, *et al* 2000; Samach, *et al.*, 1997). A finales de los años 90's se identificó a la primera proteína no MADS-box que contenía una caja CArG en su promotor, se trata de la proteína NAP (NAC-LIKE, ACTIVADO POR AP3/PI), *la cual* pertenece a la familia de factores transcripcionales NAC (Sablowski y Meyerowitz, 1998). Entre los genes blanco de los genes de la función B identificados se encuentran factores de transcripción, proteínas implicadas en transducción de señales, así como proteínas estructurales como  $\alpha$  y  $\beta$  Tubulina, aunque su función en tanto blancos de los genes MADS aun no es clara (Honma y Goto,2001; Bey *et al.*, 2004).

Estrategias como "*genome wide-expression*" también han permitido analizar algunos de los genes blanco de AG, una proteína tipo C. Se encontró que AG tiene como blanco a AP3, PI, los genes SEP1/2 y al mismo AG, además de nuevas interacciones no reportadas anteriormente (Pelaz *et al.*, 2000; Gómez Mena *et al.*, 2005). Estas observaciones proporcionan evidencias fuertes que apoyan la existencia de complejos mayores entre las mismas proteínas MADS-box (Theissen 2001; Immink *et al.*, 2009),

### ***Los dímeros MADS y los complejos mayores***

La formación de dímeros y de complejos multiméricos entre los factores de transcripción provee un mecanismo para incrementar de forma notable la diversidad de posibles combinaciones de proteínas de unión al DNA, los cuales pueden llevar a una mayor especificidad en la selección del gen blanco. Inicialmente se demostró que las proteínas MADS forman preferencialmente heterodímeros, consistentes de dos proteínas diferentes. Por ensayos de doble híbrido, se encontraron más de 260 dímeros formados entre éstas proteínas, demostrando el potencial que tienen para heterodimerizarse (Egea-Cortines, 1999). Posteriormente con la técnica de "*ternary factor trap*" se demostró además que estas proteínas también podían formar complejos de mayores órdenes de

magnitud (Egea-Cortines, 1999; Thiessen *et al.*, 2001). Se encontró que las proteínas DEF, GLO y SQUA pueden interactuar de forma multimérica a través del extremo C-terminal. Estos y otros análisis en *Arabidopsis* llevaron a proponer “el modelo del cuarteto”; el cual postula que la combinación de dos dímeros forman complejos tetraméricos que son esenciales para la especificación de la identidad de órganos florales (Figura 5 del Apéndice 1) (Theissen, 2001; Theissen, G. y Saedler, 2001).

En el caso de *Antirrhinum*, los complejos ternarios entre las proteínas DEF, GLO y SQUA únicamente se detectaron cuando dos cajas CArG se encontraban dentro del promotor de *GLO* (Egea-Cortines, 1999). Este resultado apoyó el modelo del cuarteto que postula que la unión de complejos multiméricos requiere de 2 cajas CArG en la misma cadena del DNA (Jack, 2001; Theissen, 2001; Theissen, y Saedler, 2001). Sin embargo, esto no puede aplicarse a todas las proteínas MADS, ya que no todos los genes blanco conocidos poseen dos cajas CArG definidas en su secuencia promotora (Jack, 2001). El caso del promotor de *SHATTERPROOF (SHP2)*, solo contiene una caja CArG perfecta (CC[AT]6GG), la cual es un blanco directo de AG (Savidge, *et al.*, 1995). Aunque en algunos casos solo se ha identificado claramente solo una caja CArG, no se descarta la posibilidad de que exista una segunda secuencia semejante a la caja CArG que pueda ser reconocida por proteínas con caja MADS, y que sean parte de un complejo multimérico, aunque el pegado a dicho motivo ocurra con una menor afinidad que en el primero.

Otro posible escenario, que puede afectar la especificidad de unión al DNA por las proteínas MADS, es la posible interacción de otros cofactores. Para las proteínas MADS de levaduras y mamíferos parece ser un fenómeno común en (Messenguy y Dubois, 2003), así como en otras familias de factores de transcripción (Remenyi *et al.*, 2004). Esta propuesta de cofactores involucrados, se basa en el hallazgo de cajas CArG cercanas a sitios de reconocimiento de factores NF-Y en el segundo intrón de AG (Hong *et al.*, 2003). Otros estudios han revelado la interacción de

proteínas MADS y proteínas de otras familias han mostrado una proteína putativa de unión al RNA (Pelaz *et al.*, 2001), entre las que podemos mencionar a una proteína con actividad de fosfatasa (Remenyi *et al.*, 2004) y una proteína rica en leucina que podría tener actividad de cinasa (Gamboa *et al.*, 2001; Acevedo *et al.*, 2004).

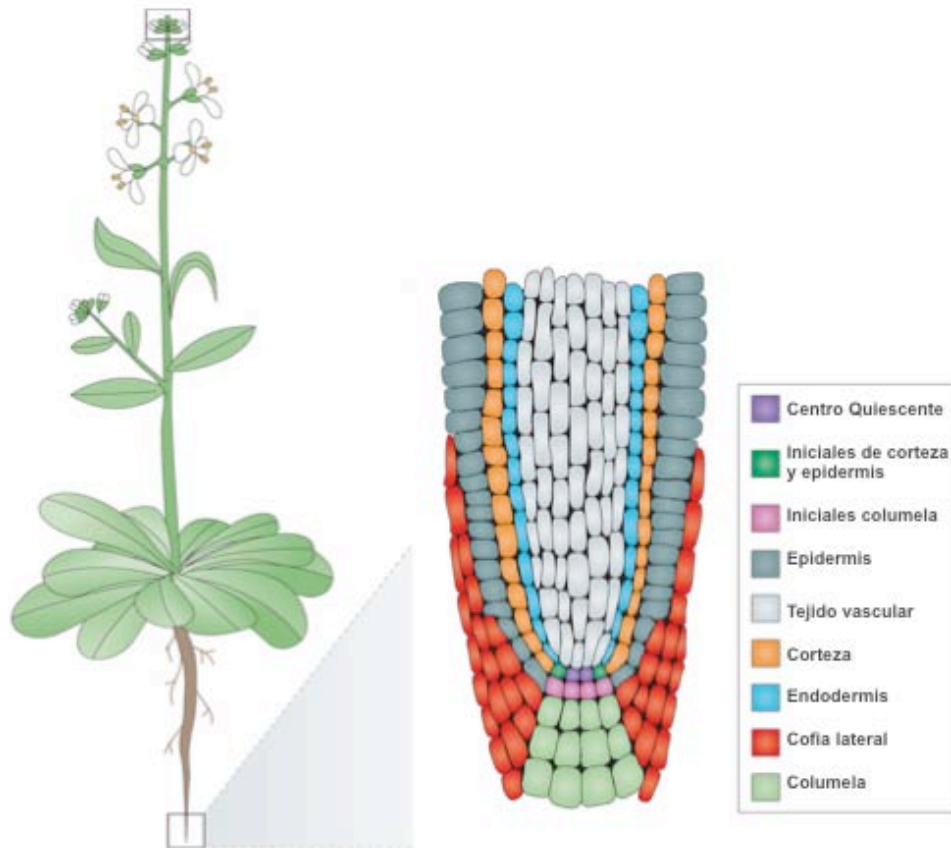
Como se ha descrito, los factores de transcripción son reguladores importantes de procesos celulares y la enorme complejidad de los seres vivos necesita de un gran número de éstos factores y de una compleja red de interacciones entre ellos, y otros componentes moleculares y no moleculares (Alvarez-Buylla *et al.*, 2010; Espinosa-Soto *et al.*, 2014).

### ***El desarrollo de la raíz de Arabidopsis***

El establecimiento del plan básico corporal de una planta adulta se lleva a cabo desde el desarrollo embrionario. El cual es un proceso altamente polarizado, con la formación de un eje ápico-basal o raíz-vástago aéreo (Scheres y Wonkelfelt, 1998; Taiz y Zaiger, 2006). Durante la embriogénesis, se originan dos poblaciones de células pluripotenciales, que crecen en direcciones opuestas durante el ciclo de vida de la planta: SAM, que genera los órganos aéreos de la planta, y el meristemo apical de raíz o RAM (Root Apical Meristem, por sus siglas en inglés) que da lugar al desarrollo de todo el sistema radicular. El SAM produce continuamente células que se van incorporando poco a poco a la formación de los tejidos del tallo, órganos laterales hojas, flores y meristemos axilares (Carles y Fletcher, 2003). El RAM se forma durante el estado medio de corazón, mientras que el meristemo apical del vástago aéreo aparece durante el estado de torpedo (Scheres y Wolkenfelt, 1998). En *Arabidopsis*, después de la fertilización, el cigoto se divide y desarrolla subsecuentemente en un embrión que pasa por diferentes estadios, iniciando con el estado globular, estado de corazón, de cotiledón, de torpedo y de cotiledones doblados todos ellos dentro de la semilla antes de la germinación (Dolan *et al.*, 1993; Jürgens, 1995, Scheres y Wolkenfelt, 1998).

Los haces vasculares de la raíz se componen de dos elementos floemáticos y dos xilemáticos. La epidermis a su vez está compuesta por dos tipos celulares, cuya identidad depende de su posición relativa con respecto a las células de la corteza que se encuentran por debajo de ésta capa celular. Las células epidérmicas que están en contacto con las paredes anticlinales que dividen a dos células corticales se diferencian en los tricoblastos o células portadoras de pelos radiculares. Mientras que los atricoblastos se diferencian a partir de células que están adyacentes a una sola célula de la corteza, Figura 3 (Dolan *et al.*, 1993; Scheres y Wolkenfelt, 1998; Dubrovsky *et al.*, 2008). El RAM está rodeado por la cofia lateral, que secreta gran cantidad de moléculas, y que junto con la columela permiten la protección del meristemo mientras la raíz crece en el suelo o sustrato. Las capas de células más externas de la cofia y columela pueden separarse o desprenderse de la raíz conforme ésta va creciendo o avanzando en el sustrato (Dolan *et al.*, 1993; Scheres y Wolkenfelt, 1998; Scheres *et al.*, 2002).

En la parte más apical de la raíz o zona meristemática, existe un grupo de células que se dividen con una frecuencia muy baja, aproximadamente de 10 a 15 veces menor que el resto de las células del meristemo (Dubrovsky *et al.*, 2009). Este conjunto de células se conoce como Centro Quiescente (CQ), el cual constituye el reservorio de las células iniciales o troncales que posteriormente darán lugar al resto de las células de la raíz. Cuando una célula del CQ se divide, da origen a dos células hijas, una de éstas formará parte del CQ y la otra dará origen a una célula inicial. Las células de CQ hacen contacto con todas las células iniciales y son requeridas para mantener su identidad de “células troncales” (van der Berg *et al.*, 1997). La columela se origina del primer grupo de células iniciales, del segundo grupo se origina la cofia lateral y la epidermis; un tercer grupo de células iniciales origina a las células de la corteza y endodermis. Finalmente el cuarto grupo dará origen al periciclo y a los tejidos provasculares del cilindro central de la raíz (Dolan *et al.*, 1993; Scheres y Wolkenfelt, 1998) ver Figura 3.



**Figura 3. *Arabidopsis* y estructura de la raíz.** La raíz de *Arabidopsis* es relativamente pequeña (80-100  $\mu\text{m}$  de diámetro) con una estructura radial simple y semitransparente, que se encuentra en el ápice inferior de la planta y está compuesta por anillos concéntricos de capas de tejido a lo largo de un eje radial y por zonas de diferentes etapas del desarrollo morfológicamente distinguibles a lo largo del eje longitudinal. A partir de un corte transversal de afuera hacia adentro encontramos que está formada por capas unicelulares concéntricas: epidermis, corteza, endodermis y periciclo, siendo ésta última la capa rodea a los tejidos vasculares (Dolan *et al.*, 1993). Modificada de Sparts *et al.*, 2013.

Se sabe que la determinación del destino celular involucra la interpretación continua de señales posicionales provenientes de las células más maduras, guiando el destino de las células iniciales del mismo tejido (van der Berg *et al.*, 1995). Van der Berg y colaboradores demostraron la importancia del papel del CQ y su posición en el destino celular de las células iniciales; al eliminar a las células de CQ, las células meristemáticas adyacentes que ocupaban su lugar detenían su

división para diferenciarse y adquirir una nueva identidad celular correspondiente a posición que ocupaban en ese momento (van der Berg *et al.*, 1995).

Las raíces laterales surgen a partir del periciclo. Las células maduras del periciclo, en posiciones específicas a lo largo del eje ápico-basal de la raíz primaria, y dan lugar al meristemo de las raíces secundarias a través de una serie ordenada de divisiones celulares con una organización celular semejante al meristemo de la raíz primaria (Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2001). Las células fundadoras de las raíces laterales se reclutan a partir de las células del periciclo adyacentes al polo del xilema de la raíz primaria. En *Arabidopsis* las raíces laterales se forman a partir de un número mínimo de 3-6 células fundadoras del periciclo de la raíz primaria, dependiendo si la iniciación es de tipo longitudinal unicelular o bicelular, en contraste a la formación de hojas que requieren de aproximadamente 30 células fundadoras a partir de la periferia del meristemo apical del vástago aéreo (Dubrovsky *et al.*, 2008; Ivanchenko *et al.*, 2010). Las células del periciclo del polo del xilema, tienen características citológicas típicas de células meristémicas tales como citoplasma denso, núcleo grande, y pequeñas vacuolas (Dubrovsky *et al.*, 2008). Una vez que se han establecido las raíces laterales, se inicia la actividad de sus propios meristemas apicales.

Dubrovsky y colaboradores demostraron que la auxina es una de las señales locales más importantes para la especificación de las células fundadoras a partir de las cuales se originan las raíces laterales (Dubrovsky *et al.*, 2008 y 2010). La adquisición de la identidad de las células troncales y la activación de la respuesta a auxinas precede a la iniciación de la formación de los primordios de raíces laterales, siendo independiente de la activación del patrón de división celular para el desarrollo de los primordios de las raíces laterales (Dubrovsky *et al.* 2008; Ivanchenko *et al.* 2010).

## ***Las hormonas vegetales y su relación con el desarrollo de la raíz.***

Las hormonas vegetales coordinan el desarrollo modulando el crecimiento en respuesta a señales intrínsecas y ambientales que pueden desencadenar stress celular. Son un grupo de pequeñas moléculas sin relación estructural derivadas de diferentes vías metabólicas (Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Los estudios realizados en las últimas décadas relacionados con fitohormonas se basaron primordialmente en el análisis de mutantes, con los que se generó una extensa lista de genes relacionados con la biosíntesis y catabolismo, así como de genes que codificaban para receptores y componentes de señalización de las diferentes hormonas (Benková y Hejác̄tko, 2008; Dugardeyn, J. *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2008; Bishopp *et al.*, 2006). Las principales hormonas implicadas en regular el desarrollo, y las que más se han estudiado hasta ahora, son las auxinas, los brasinosteroides, las citoquininas (Ck's) y las giberelinas (GA's), mientras que el ácido abscísico (ABA), el ácido jasmónico y el etileno están más a menudo asociados a respuestas de stress (Taiz y Zeiger, 2006; Depuydt y Hardtke, 2011). En la Tabla 1 se describen brevemente las funciones y lugar de síntesis de las fitohormonas más estudiadas. El papel de las auxinas será descrito posteriormente con mayor detalle.

### ***El papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz***

Dentro del grupo de las hormonas vegetales, las auxinas son probablemente las fitohormonas más estudiadas y su función se ha relacionado principalmente con la formación de raíces. Las auxinas están involucradas en cada aspecto del crecimiento y desarrollo de las plantas y se sintetiza en tejidos apicales en desarrollo y su biosíntesis se lleva a cabo por dos vías independientes (Taiz y Zeiger, 2006; Ivanchenko *et al.*, 2010). Una vez sintetizadas se transportan a tejidos específicos donde desencadenan una cascada de señalización involucrada en el desarrollo.



La relación de las auxinas con la formación de las raíces, se demostró a partir de experimentos clásicos de aplicación exógena de auxinas, donde se encontró que esta hormona favorece la formación de raíces secundarias, sugiriendo que juegan un papel importante en su formación (Dubrovsky *et al.*, 2008). Los estudios de mutantes deficientes en esta fitohormona han puesto en evidencia no solo defectos en la embriogénesis, sino también han permitido estudiar la relación de la síntesis, transporte y respuesta a esta hormona durante el desarrollo de la raíz (Jenik, *et al.*, 2007).

Las auxinas participan en funciones celulares como la expansión y división celular, así como en la definición del destino celular. Particularmente en el último caso, las auxinas promueven eventos de especificación del destino celular dependiendo del tipo célula donde se encuentren (Delloio *et al.*, 2007 y 2008). Por ejemplo, la formación de raíces es promovida en la parte basal del embrión (Weijers *et al.*, 2006), mientras que la iniciación de las raíces laterales es activada en las células del periciclo (Dubrovsky *et al.*, 2008), y la iniciación de los cotiledones es disparada en las células apicales del embrión (Hardtke *et al.*, 2004).

Recientemente se ha probado que las auxinas también intervienen en el desarrollo de los órganos florales (Aloni *et al.*, 2006; Cecchetti *et al.*, 2008; Yunde 2010; Vanstraelen y Benková, 2012). En el caso del gametofito femenino se ha reportado que el desarrollo es regulado por la biosíntesis de auxinas (Pagnussat *et al.*, 2009). La señalización y distribución normal de auxinas se requieren para la formación correcta del patrón del saco embrionario y para la especificación de las células gaméticas y no gaméticas. A través de una construcción reportera típica para monitorear auxinas (DR5-GFP), se encontró una distribución asimétrica en el saco embrionario, con un máximo de expresión en el polo micropilar (Pagnussat *et al.*, 2009).

**Tabla 1. Las hormonas vegetales y su función en la planta.**

Hormona	Síntesis en:	Funciones
Auxinas (IAA)	Embriones ; meristemos apicales, hojas jóvenes	Estimular la elongación del tallo (a bajas concentraciones), crecimiento de la raíz, diferenciación celular, ramificación; regula el desarrollo de las frutas; incrementa la dominancia apical; interviene en fototropismo y gravitropismo; promueve la diferenciación del xilema; retarda la caída de las hojas
Citoquininas (CKs)	Raíces y de ahí se transporta a otros órganos	Afecta el crecimiento y diferenciación de la raíz; estimula la división y crecimiento celular; retrasa senescencia
Giberelinas (GAs)	Meristemos de yemas apicales y raíces, hojas jóvenes y embriones	Promueve la germinación y formación de brotes, la elongación del tallo y crecimiento de las hojas; estimula la floración y desarrollo de frutos; afectan el crecimiento y diferenciación
Brasinoesteroides (BRs)	Semillas, frutos, tallos, hojas, y brotes florales	Inhiben el crecimiento de la raíz; retardan la caída de las hojas; promueven la diferenciación del xilema; promueven la elongación de tallos y tubo polínico
Acido absícico (ABA)	Hojas, tallos, raíces y frutos verdes	Inhibe el crecimiento; cierran estomas durante estrés de agua; promueven la dormancia de las semillas
Etileno	Tejidos de frutos maduros, nodos de tallos, hojas viejas y flores	Promueven la maduración de los frutos; promueven o inhiben el crecimiento y desarrollo de raíces, hojas y flores, dependiendo de la especie. Inhibe elongación del tallo y gravitropismo
Acido jasmónico (JA)	En cloroplastos, citosolo y peroxisoma y se distribuyen a toda la planta vía tejido vascular	Media las respuesta a stress biotico y abiótico así como aspectos del crecimiento y desarrollo. Modulan aspectos relacionados con maduración de frutos, producción de polen, resistencia de las plantas a insectos y patógenos

Tomada de Bishop y Koncz, 2002; Weber, 2002; González-García *et al.*, 2006; Aloni *et al.*, 2006; Ortega-Martínez *et al.*, 2007; Mutasa-Göttens y Hedden, 2009; Santner y Estelle, 2009; Garay-Arroyo *et al.*, 2012; Yamada y Sawa, 2013.

Ahora se sabe que las auxinas se sintetizan a través de diferentes vías durante el desarrollo de la planta, como en el embrión, en los primordios de hojas, de las raíces y en las semillas en desarrollo (Wooward y Bartel, 2005). Su transporte activo da lugar a gradientes y las vías que regulan su transporte activo son fundamentales para el establecimiento de dichos gradientes. Algunos de los componentes fundamentales de estas vías son los transportadores de eflujo tipo PIN-FORMED (PIN) (Blilou *et al.*, 2005; Sabatini *et al.* 2007; Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). Los acarreadores de influjo AUXIN1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) y los transportadores MULTIDRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEIN (para revisión ver Vieten *et al.*, 2007; Garay *et al.*, 2012) Una vez alcanzadas las concentraciones, las auxinas inducen respuestas específicas que disparan diferentes efectos fisiológicos y del desarrollo (Teale *et al.*, 2006). Por mucho tiempo se pensó que solo en los tallos o brotes aéreos eran los sitios de síntesis de las auxinas, y que su acción en otras partes de la planta dependía del transporte polar de las auxinas. Ahora es claro que tanto en los tallos aéreos como en las raíces se produce esta hormona (Zhao, 2010).

### ***Regulación del tamaño y mantenimiento del meristemo de la raíz a nivel hormonal***

El crecimiento, especificación y mantenimiento del meristemo apical de la raíz de *Arabidopsis*, es el resultado del balance entre las divisiones celulares en el meristemo proximal y la diferenciación celular en las zonas de elongación/diferenciación. La especificación de las células troncales en la raíz y su mantenimiento requiere de la acción convergente de fitohormonas, factores de transcripción, así como de las vías de señalización de algunos péptidos, los cuales constituyen la base de los mecanismos moleculares que gobiernan estos procesos (Vanstraelen y Benková, 2012; Sozzani y Pascuzzi, 2014).

Los factores de transcripción *PLETHORA* (*PLT 1-4*) son reguladores maestros del destino de la raíz basal, y juegan un papel clave en la especificación de las células

troncales desde de la embriogénesis temprana hasta etapas de desarrollo posteriores (Aida *et al.*, 2004; Blilou *et al.*, 2005; Galinha *et al.*, 2007). Las auxinas pueden acumularse principalmente dentro de la región distal de las células troncales por dos vías: 1) la biosíntesis local (Stepanova *et al.*, 2008) y 2) por el transporte polar a partir del tallo aéreo (Blilou *et al.*, 2005), donde se da una respuesta máxima de auxinas necesaria para la función del CQ (Blilou *et al.*, 2005; Křeček *et al.*, 2009). Estas hormonas se transportan por las familias de transportadores PINFORMED (PIN) facilitadoras del eflujo de auxinas, y las mismas auxinas son las que dirigen la expresión graduada de los genes *PLT* (Grieneisen *et al.*, 2007; Galinha *et al.*, 2007). Altas concentraciones de PLT en la punta de la raíz, especifican y mantienen el nicho de las células troncales. En contraste los niveles bajos de estas proteínas correlacionan con la diferenciación de las células troncales (Galinha *et al.*, 2007). Los altos niveles de PLT en el CQ también están controlados por factores de crecimiento de la raíz a nivel transcripcional y traduccional (Matsuzaki *et al.*, 2010).

Un mecanismo paralelo para el mantenimiento de las células troncales de la raíz involucra a dos miembros de la familia de factores de transcripción GRAS, *SHORT-ROOT (SHR)*, *SCARECROW (SCR)*, así como algunos de sus genes blanco y proteínas interactoras (Sabatini *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2007; Welch *et al.*, 2007; Sozzani *et al.*, 2010). *SHR* se transcribe en el estele y se mueve por la endodermis, hacia la capa de las células iniciales de cortex/endodermis y al CQ, donde activa primero la transcripción de *SCR*, regula la división asimétrica de las células del cortex/endodermis, y mantiene la identidad del CQ (Helariutta *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2007). Por su parte, *SCR* se requiere en el CQ para mantener la actividad de las células troncales, los genes *PLT* a su vez controlan la expresión de los genes *PIN* para estabilizar el máximo de auxinas y por lo tanto la actividad del nicho de las células madres (Blilou *et al.*, 2005; Sabatini *et al.*, 2003). Es importante señalar que la vía *SHR/SCR* regula el destino de las células troncales por la modulación de los genes del ciclo celular involucrados en la divisiones asimétricas (Sozzani *et al.*, 2010). La actividad de SHR y SCR dentro del CQ,

células iniciales de cortex/endodermis y endodermis también se encuentra afectada por algunos de sus genes blanco o corriente abajo *MAGPIE (MGP)*, y *JACKDAW (JKD)* (Levesque *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2007). Un elemento más requerido en el CQ para el mantenimiento de las células troncales de la columela es *WUS-REALTED HOMEBOX (WOX5)*, un factor de transcripción con dominio HOMEO cuya expresión es regulada por *SCR* (Sarkar *et al.*, 2007). En el CQ, *WOX5* actúa de manera similar a su homólogo *WUSCHEL (WUS)*, factor que actúa en el centro organizador del meristemo del tallo apical. El gen *WUS* regula el tamaño de la población de células troncales del meristemo del tallo apical a través de una asa de retroalimentación negativa que involucra al decapeptido glicosilado *CLAVATA 3 (CLV3)* (Casamitjana *et al.*, 2003). Un circuito similar se ha demostrado que funciona en el meristemo de la raíz para limitar la proliferación de las células troncales de la columela (Stahl *et al.*, 2009).

Las auxinas en altas concentraciones promueven la degradación de las proteínas *AUXIN7INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA)* mediada por la vía de ubiquitinación/Proteosoma 26S (Scacchi *et al.*, 2010). A su vez las proteínas *Aux/IAA* son represores de la unión de algunos miembros de otra familia importante de factores de transcripción involucrada en la regulación de la respuesta de auxinas, las *AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF's)* (Smalle y Vierstra, 2004; Guilfoyle y Hagen, 2007). En *Arabidopsis*, *ARF5/MONOPTEROS (MP)* es un activador transcripcional necesario para la especificación de la hipófisis. Los mutantes en *mp* presentan plántulas sin raíz debido a la división aberrante de la hipófisis durante la embriogénesis temprana. Otro de los genes de esta familia, es *BODENLOS (BDL)/IAA12* interactúa con MP y el heterodímero que forman inhibe la actividad transcripcional de MP (Lau *et al.*, 2011). Por lo tanto, las auxinas dirigen a BDL para la degradación por el Proteosoma 26S permitiendo a MP activar la transcripción de los genes necesarios para la especificación de la hipófisis. Dentro de las señales celulares no autónomas que regulan este proceso, están las mismas auxinas, que autocontrolan su acumulación, así como los niveles de *PIN1* (Friml *et al.*, 2003). La proteína *TMO7 (TARGET OF MP 7)*, es otro de los

componentes de esta compleja red de regulación para la iniciación de la raíz dependiente de MP, cuya transcripción también es activada por MP (Schlereth *et al.*, 2010; Vanstraelen y Benková, 2012).

El patrón y crecimiento del meristemo de la raíz es guiado por la señalización cruzada de las diferentes fitormonas. Las citocininas (CK), las auxinas, las giberelinas (GAs) y los brasinoesteroides (BRs) actúan como los principales factores en el control del tamaño del meristemo de la raíz. La interacción antagónica de auxinas/citoquininas es crucial para la posición de la zona de transición y para mantener el tamaño de meristemo de la raíz (Dello loio *et al.*, 2007; Dello loio *et al.*, 2008; Moubayidin *et al.*, 2010). Por su parte SCR mantiene la actividad de las células troncales por la represión de la diferenciación celular dependiente de citoquinina, al suprimir directamente la expresión en el CQ de *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1 (ARR1)* el regulador de la respuesta a citoquininas (Sabatini *et al.*, 2003; Moubayidin *et al.*, 2013). La activación regulada por citoquininas involucra al gen *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)*, un regulador clave de la actividad que participa en la inducción de la diferenciación celular en la zona de transición del meristemo de la raíz. *SHY2* forma parte de la familia de los represores de la señalización de auxinas Aux/IAA. Las CKs activan la transcripción de *SHY2* en el tejido vascular de la zona de transición a través de *ARR1*, factor de transcripción de la respuesta primaria a la CKs (Dello loio *et al.*, 2008). Teniendo como resultado la inhibición de la señalización de auxinas y la expresión de *PIN*, promoviendo la diferenciación celular (Dello loio *et al.*, 2008).

Una vez iniciada la germinación, el crecimiento del meristemo de la raíz está controlado por un incremento en la tasa de diferenciación celular relativa a la tasa de división celular, que están correlacionados con la activación de los niveles de *SHY2* dependientes de CKs (Moubayidin *et al.*, 2010). Después de la germinación, los niveles de la expresión de *SHY2* disminuyen por *ARR12* otro factor de transcripción de respuesta a CKs, Las GAs, son reguladores adicionales del crecimiento de la raíz, reprimen selectivamente la expresión de *ARR1* en los

estados tempranos del desarrollo del meristemo, vía REPRESOR OF GAI-3 (RGA), una proteína de la familia DELLA, (Moubayidin *et al.*, 2010).

Al igual que las GAs, los BRs también promueven la expansión y proliferación celular. Los BRs se requieren para la progresión normal del ciclo celular en el meristemo de la raíz (González *et al.*, 2011). En la regulación del tamaño del meristemo de la raíz, la señalización cruzada entre las vías de BRs, auxinas y CKs juega un papel importante. Además, BREVIS RADIX (BRX) un regulador transcripcional necesario para el desarrollo de la vasculatura participa también en la regulación del crecimiento de la raíz de manera espacio-temporal siendo uno de los núcleos de la señalización cruzada entre auxinas BR's y CKs. Otra de las hormonas que participa en el mantenimiento del nicho de las células troncales es el etileno, el cual regula las divisiones en el CQ (Ortega *et al.*, 2007).

Las modificaciones post-traduccionales también juegan papeles importantes en esta compleja red de interactores, donde la sulfuración es otra de estas modificaciones involucradas en el mantenimiento del nicho de las células troncales. Además de los elementos antes mencionados, se encontró una nueva familia de péptidos sulfatados, los ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR (RGF's), que participan definiendo el dominio de expresión de los genes *PLT* (Matsuzaki *et al.*, 2010). La enzima TYROYLPROTEIN SULFOTRANSFERASE (TPST), cuya expresión es inducida por auxinas, tiene varias funciones ya que sulfura a los péptidos RGF y activa a los genes *PLT*. Estos péptidos modificados se expresan principalmente en el área de las células troncales y en la primera capa de las células de la columela. A partir de ahí se secretan y su actividad se requiere para mantener el nicho de las células troncales de la raíz y para la proliferación de las células amplificadoras del transito (Matsuzaki *et al.*, 2010).

El mantenimiento del CQ y el crecimiento de la raíz, requiere de múltiples niveles de regulación y entre los que se incluye el control post-transcripcional como la sulfatación de ciertos péptidos Una de las proteínas sulfatadas que se requieren

en este proceso y que actúan en combinación con otros dos péptidos tirosina-sulfatados es FGF1. Esta proteína interacciona con los péptidos fitosulfocina (PKS) y el péptido PSY1, los cuales tienen tirosinas sulfatadas (Matsubayashi y Sakagami, 1996; Amano *et al.*, 2007).

Otra vía alterna de control implicada en el control de la transición entre la proliferación y la diferenciación celular en el meristemo de la raíz se describió recientemente y se refiere a las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species) (Tsukagoshi *et al.*, 2010). El superóxido  $O_2^-$  y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se distribuyen diferencialmente en los tejidos de la raíz, principalmente en las células en división y expansión de las zonas del meristemo y elongación, respectivamente (Dunand *et al.*, 2007; Penel Dunand y, 2009). Como uno de los reguladores del estado REDOX en el meristemo de la raíz, es el gen *UPBEAT1* (*UPB1*), un factor de transcripción de la familia bHLH que regula la expresión de una serie de peroxidasas que modulan el balance del  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  en la zona de transición (Tsukagoshi *et al.*, 2010). La interrupción de la actividad de *UPB1* altera este balance de las ROS influenciando el tamaño del meristemo y las células debido a un bajo contenido de  $H_2O_2$  en la zona elongación/diferenciación, mientras que las plantas que sobre-expresan *UPB1* tienen meristemos más cortos relacionados con un contenido alto de  $H_2O_2$  (Tsukagoshi, *et al.*, 2010). *UPB1* parece determinar la posición de la zona de transición por la distribución de  $H_2O_2$  en la zona de elongación/diferenciación (requerida para la diferenciación) y el  $O_2^-$  en el meristemo se requiere para mantener la proliferación celular. Este mecanismo parece actuar de forma independiente de la vía de CK's/auxinas. (Tsukagoshi, *et al.*, 2010; Wells *et al.*, 2010).



## ***La transición a la floración, las vías de floración y su regulación***

En las plantas, el crecimiento se origina a partir de un grupo de células indiferenciadas llamado meristemo. Los meristemos primarios se establecen durante la embriogénesis, a partir de los cuales todos los órganos de las plantas se desarrollarán. Los meristemos secundarios, tales como los meristemos axilares y los del cambium, se originan dentro de los meristemos primarios. Los meristemos pueden ser determinados, lo que significa que se consumen durante la formación de un órgano o indeterminados, que son aquellos que permanecen activos a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta (Taiz y Zeiger, 2006). En cuanto a la inducción a la floración en las plantas anuales, los meristemos de los tallos o ápices vegetativos llevan a cabo la transición a meristemos de inflorescencia o fase reproductiva. Estos meristemos de inflorescencia permanecerán indeterminados por cierto tiempo, para posteriormente generar a los meristemos florales, los cuales son los responsables de la formación de las flores (Melzer *et al.*, 2008)

Las plantas pueden modular cambios en su estructura posterior a la embriogénesis, esta habilidad les permite hacer frente a los cambios ambientales que afectan su crecimiento. La flexibilidad mostrada durante el desarrollo y organogénesis depende de los nichos de células pluripotenciales que se encuentran en los meristemos apicales del vástago aéreo y de la raíz (Carles y Fletcher, 2003). El tiempo de floración en *A. thaliana* es un proceso complejo que depende de la integración de múltiples respuestas internas, ambientales tales como el fotoperiodo, la vernalización, la temperatura ambiental, así como del status nutricional (Koorneeff *et al.*, 2004; Engelmann y Purugganan, 2006). Como mencionamos, la transición entre la fase vegetativa y la reproductiva denominada transición a la floración, es controlada por diferentes señales ambientales y endógenas. (Carles y Fletcher, 2003; Taiz y Zeiger, 2006). Durante la fase vegetativa de crecimiento, el SAM (por sus siglas en inglés, Shoot Apical Meristem) de *Arabidopsis*, un meristemo indeterminado, produce hojas con

internodos muy cortos, generando una roseta de hojas basales. Cuando se inicia el desarrollo reproductivo, el meristemo vegetativo se transforma en el meristemo de inflorescencia primaria. Este último produce un eje de inflorescencia que lleva dos tipos de órganos laterales: hojas caulinas o inflorescencias y las flores (Carles y Fletcher, 2003, Corbesier y Coupland, 2006; Taiz y Zeiger, 2006; Coupland *et al.*, 2006; Álvarez-Buylla *et al.*, 2010). Después las yemas axilares de las hojas caulinas se desarrollan en meristemas secundarios de la inflorescencia. Las flores surgen finalmente de los meristemas florales y se forman a los lados del meristemo de inflorescencia, los cuales son determinados. El meristemo de inflorescencia de *Arabidopsis* tiene el potencial de crecer indefinidamente y entonces exhibir un crecimiento indeterminado (Carles y Fletcher, 2003, Taiz y Zeiger, 2006).

Como hemos descrito, la transición floral involucra una compleja red genética regulatoria, en la que se reconoce distintos genes por su función en este proceso, aunque algunos de éstos también pueden participar en otros procesos del desarrollo de la planta:

Los genes inductores son aquellos en los que convergen diversas señales provenientes de las vías de inducción de la floración, y que regulan la expresión de los genes de la identidad del meristemo floral (Kardailsky *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2005). Entre éstos genes tenemos a **LEAFY (LFY)**, el cual codifica para un factor de transcripción involucrado en la especificación de los meristemas florales (Weigel *et al.*, 1992; Parcy *et al.*, 1998.), y a **UNUSUAL FLORAL ORGAN (UFO)** (Lee *et al.*, 1997; Honma y Goto, 2000). También pertenece a este grupo el gen **FLOWERING LOCUS T (FT)**, que codifica para una proteína similar a la inhibidora de la Raf cinasa (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). Dentro de este grupo de genes integradores están involucrados dos genes MADS-box **SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1)**, el cual es uno de los principales integradores de las cuatro vías de inducción a la floración (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000) y **AGAMOUS LIKE 24 (AGL24)**, promotor

del destino de la inflorescencia, que participa en una vía de señalización cruzada permitiendo la comunicación entre los genes integradores (Yu *et al.*, 2004).

Los genes represores, que como su nombre los indica participan en la represión de la transición a la floración por medio de la inhibición de los genes inductores. Entre estos genes se encuentran: **FLOWERING LOCUS C (FLC)**, gen MADS-box y regulador maestro (Michaels y Amasino, 1999; Hepworth *et al.*, 2002). Así como también sus activadores como **TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)**, que codifica para una proteína similar a la inhibidora de la Raf cinasa en animales y que presenta una alta similitud en secuencia con FT (Alvarez *et al.*, 1991; Shannon y Meeks-Wagner, 1991 y 1993; Ohshima *et al.*, 1997), **SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)** que también codifica para una proteína con dominio MADS (Hartman *et al.*, 2000).

Así mismo existen genes que participan en la transición a la floración y le dan identidad a los meristemos florales. Estos genes se encargan de promover el establecimiento de los meristemos florales y de la diferenciación de ciertos tipos celulares para la morfogénesis de los órganos florales. Consideramos en el grupo de trabajo de la Dra. Álvarez-Buylla que posiblemente todos estos genes MADS-box son parte de una misma red regulatoria como lo indican los procesos en los que intervienen genes como **AP1**, que es un gen de identidad de MF, pero a su vez participa en la identidad de los sépalos. La identidad de los genes de identidad del meristemo y de meristemo floral están determinadas principalmente por el gen **TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)** el cual tienen una función antagónica a **LFY** y **AP1**. La represión mutua de estos genes permite la coexistencia de los éstos dos tipos de meristemos (Ratcliffe *et al.*, 1999). Otros representantes de éste tipo de genes son **LFY** y **CAULIFLOWER-CAL**. Además de las funciones citadas anteriormente para **LFY**, éste juega un papel dual en la regulación de la identidad del meristemo floral y en el patrón de formación de los órganos florales, y su expresión está controlada por diversas vías de floración (Blázquez y Weigel, 2000; Parcy *et al.*, 1998). El meristemo floral finalmente se diferencia en meristemo de

inflorescencia para dar origen a los diferentes órganos florales, a través de la activación de los genes ABC.

En *Arabidopsis* se han descrito cuatro vías principales que controlan la transición a la floración. Sin embargo, es importante resaltar que estas vías mantienen una estrecha comunicación durante el proceso y están integradas por módulos complejos de interacciones que permiten su retroalimentación (Blázquez y Weigel 2000; Alvarez Buylla *et al.*, 2011). Estas cuatro vías de regulación de la floración se definen de la siguiente manera: una dependiente de la duración del día o **fotoperiodo**; una dependiente de las bajas temperaturas denominada **vernalización**; una independiente del fotoperiodo denominada **autónoma**; y una más dependiente de la **Giberelinas (GAs)**, cuyo efecto es más evidente durante fotoperiodos cortos, figura 3 (Mouradov *et al.*, 2002; Simpson y Dean, 2002; Boss *et al.*, 2004; Putterill *et al.*, 2004).

### ***La vía del Fotoperiodo.***

La regulación de la floración ha sido estudiada por más de 100 años (Kobayashi y Weigel, 2007). Los primeros estudios establecieron que la floración en las plantas está regulada por factores ambientales que incluyen a la duración del día (fotoperiodo). En el fotoperiodo descrito originalmente por Garner y Allard en 1920, se demostró que una gran cantidad de plantas florecen en respuesta a cambios en la duración del día (Taiz y Zeiger, 2006; Kobayashi y Weigel, 2007). De acuerdo con esta respuesta en el tiempo para florecer, las plantas pueden ser clasificadas como de día largo, donde su floración se induce cuando la duración del día excede cierto umbral, plantas de día corto que florecen cuando el periodo de luz es corto y las noches son más largas, y plantas de día neutro cuya floración no depende de la duración del día (Leyser y Day, 2003; Taiz y Zeiger, 2006). Estas observaciones, por consiguiente llevaron a preguntarse de qué manera y en qué sitio las plantas detectaban el fotoperiodo (Srikanth y Schmid, 2011).

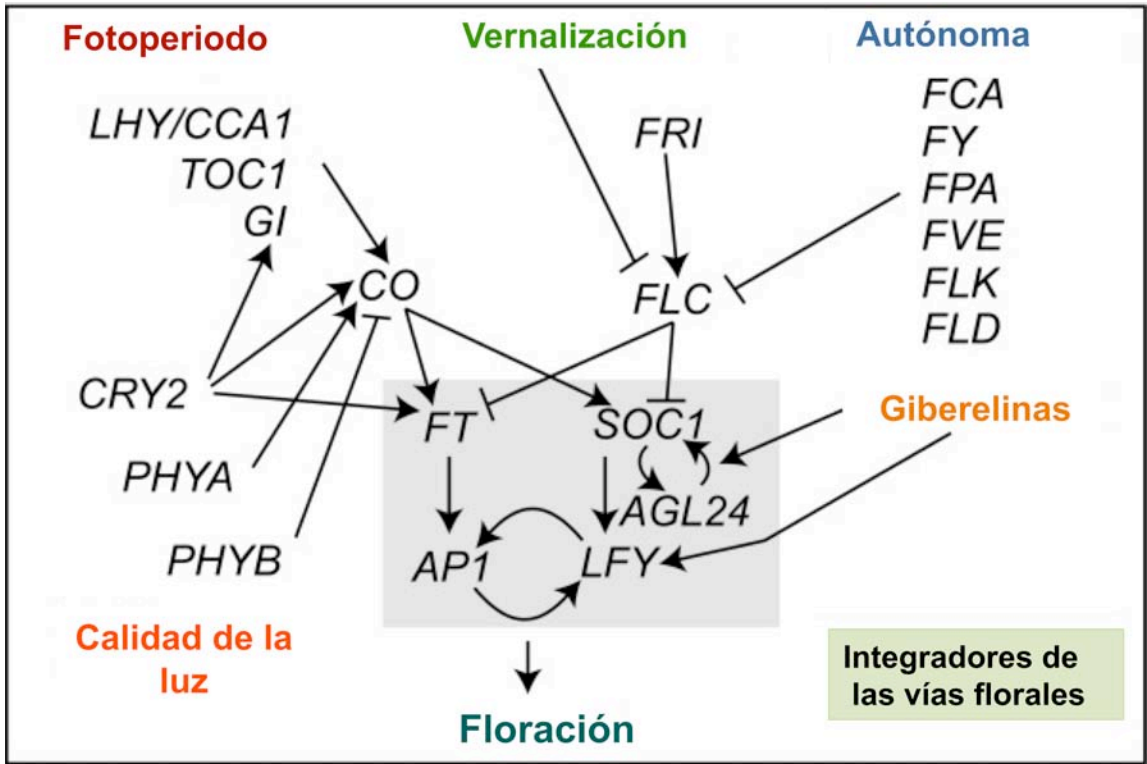


Figura 3. Vías de inducción a la floración. Se muestran las cuatro vías involucradas en la transición a la floración. En el cuadro gris se muestran a los genes en los que convergen las diferentes vías y que las integran para iniciar la floración. Modificada de Ballerini y Kramer, 2011.

Los organismos generalmente están sujetos a ciclos diarios de luz y oscuridad, y tanto las plantas como los animales a menudo exhiben comportamientos rítmicos en asociación con estos cambios. Ejemplos de tales comportamientos rítmicos incluyen el movimiento de hojas y pétalos (posiciones de día y noche), cerrado y apertura de estomas, patrones de crecimiento y esporulación en hongos (*Pilobolus* y *Neurospora*), hora del día de la emergencia de las pupas (*Drosophila*), y los ciclos de actividad de algunos animales, así como los procesos metabólicos tales como la capacidad fotosintética y la tasa respiratoria de las plantas (Taiz y Zeiger, 2006).

La cascada de eventos responsable de medir la duración del día y subsecuentemente activar la floración, es conocida como la vía del fotoperiodo (Srikanth y Schmid, 2011). Los relojes circadianos permiten o dan capacidad a los organismos para detectar la duración del día y de la noche, en los cuales ocurren varios eventos bioquímicos y/o moleculares. Los ciclos circadianos y el fotoperiodo tienen la propiedad común de responder a los ciclos de luz/oscuridad. En *Arabidopsis*, el reloj circadiano y el fotoperiodo se encuentran íntimamente ligados en la regulación del proceso de transición a la floración (Imaizumi, 2009).

Diversos estudios han mostrado que el sistema del reloj circadiano, se compone, entre otras cosas, de un oscilador central que es el núcleo del sistema, y el responsable de conducir los ciclos de 24 h (Hayama y Coupland, 2004). Estudios genéticos y moleculares del reloj circadiano en diferentes organismos, han mostrado que este oscilador se autoregula transcripcional y traduccionalmente a través de un circuito de retroalimentación negativa (Suárez-López *et al.*, 2001). En *Arabidopsis*, el sistema del reloj circadiano incluye por lo menos tres circuitos de retroalimentación que se encuentran interconectados (Hayama y Coupland, 2004). Algunos de los genes que forman parte de estos circuitos de retroalimentación son *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELOGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *TIMMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*, *LUX ARRHYTHMO (LUX)* Y *EARLY FLOWERING (ELF4)* (Suárez-López *et al.*, 2001; Imaizumi *et al.*, 2005; Langercrantz, 2009).

El oscilador central regula principalmente la expresión del gen *CONSTANS (CO)*. Este gen se aisló a partir de una mutante que presentaba retraso en su tiempo de floración específicamente bajo días largos (Putterill *et al.*, 1995). *CO* es un factor de transcripción tipo “dedos de zinc” altamente regulado por la luz a nivel transcripcional y a nivel de la estabilidad de su proteína, y constituyendo puntos cruciales para la detección de la duración del día (An *et al.*, 2004; Hayama y Coupland, 2004). La función de *CO* es promover la floración estimulando la expresión de dos genes MADS-box corriente abajo *FT* y *SOC1*, cuya expresión

está controlada también por el ciclo circadiano, con un pico máximo de actividad cerca del anochecer. Se han identificado varias proteínas que regulan la expresión o estabilidad de la proteína CO, entre las que podemos citar a: FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT AND F-BOX 1 (FKF1), GIGANTEA (GI), EARLY FLOWERING 2 (ELF3), CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1) y RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2 (RFI2) (Fowler *et al.*, 1999; Suárez-López *et al.*, 2001; Chen y Ni, 2006; Imaizumi *et al.*, 2003; Imaizumi *et al.*, 2005;).

Diversos estudios han demostrado que el sitio de percepción del fotoperiodo se encuentra principalmente en las hojas y que la señal derivada debe ser enviada al meristemo apical. Como la expresión de CO se restringe a las células acompañantes del floema, y su proteína en el meristemo apical no es capaz de inducir la floración, se propuso que era otra la señal por debajo de CO la que se encargaba de promover la floración (Suárez-López *et al.*, 2001; An *et al.*, 2004; Wenkelet *et al.*, 2006).

*FKF1* y *GI* son activadores de CO, mientras que *ELF3*, *CDF1* y *RFI2* funcionan como represores de su actividad. Es interesante hacer notar que la expresión de estos genes se encuentra también regulada por el ciclo circadiano (Imaizumi y Kay, 2006). Durante la mañana, CDF1 se une al promotor de CO reprimiendo su transcripción, conforme aumentan los niveles de GI, esta interactúa con CDF1 formando un complejo con el cual posteriormente FKF1 interactúa a través de GI. FKF1 es una E3 ligasa con caja F, que ubiquitina a CDF1 induciendo su degradación por el proteosoma, y favoreciendo la transcripción de CO por GI. De forma independiente ELF3 puede suprimir la expresión de *FKF1* y *GI*, y por lo tanto, también la expresión de CO (Imaizumi *et al.*, 2003; Imaizumi *et al.*, 2005; Imaizumi y Kay, 2006; Sawa *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, otro punto de regulación de CO se da a nivel post-transcripcional, a través de la regulación de la estabilidad y acumulación de la proteína de CO, la cual es mayor hacia el final del día y esta regulada

diferencialmente por la luz percibida por algunos fotorreceptores (Valverde *et al.*, 2004). PHYA, CRY1 y CRY2 protegen a CO de la degradación principalmente hacia el final del día. Además, la regulación de CO, se da también a nivel postraduccional en respuesta a los días largos. La señalización de PHYB cuya actividad es mayor en las mañanas, promueve su degradación posiblemente vía RFI2 (Imaizumi y Kay, 2006). La proteína CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC (COP1) y algunos miembros de la familia SUPPRESSOR OF PHYA-105 (SPA), también participan en la ubiquitinación y degradación de CO por el proteosoma 26S (Laubinger *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Srikanth y Schmid, 2011; Andrés y Coupland 2012). La actividad de este complejo se reprime por la luz, principalmente promoviendo la degradación de la proteína CO en la oscuridad.

Se ha postulado que algunos de los efectos de CO en la floración son mediados por el gen *FT*. En *Arabidopsis* la expresión de CO durante los días largos resulta en un incremento en la abundancia del RNAm de *FT* en el floema. Sin embargo, a diferencia de CO, FT estimula la floración en el floema o en el meristemo apical. Bioquímicamente, FT está relacionado a un pequeño grupo de proteínas regulatorias llamadas inhibidores de RAF cinasas (An *et al.*, 2004; Corbesier y Coupland 2005). En mamíferos, esta familia de RAF cinasas ayudan a iniciar la cascada de proteínas-cinasas activadas por mitógenos. La floración en *Arabidopsis* ocurre cuando CO se expresa durante el periodo de luz. La expresión de CO es mayor en el floema de las hojas y los tallos (An *et al.*, 2004). El gen blanco de CO es *FT*, que se expresa específicamente en el floema. CO parece actuar específicamente en el floema de las hojas para estimular la floración en días largos (Samach *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2005).

Diversos experimentos sugieren que la proteína FT es transportada a través del floema hacia el meristemo (Corbesier *et al.*, 2007). Una vez que FT se encuentra en el meristemo, probablemente forme un complejo con FLOWERING LOCUS D (FD) un factor de transcripción bZIP, para activar la transcripción de los genes de



identidad floral *AP1* y *FUL*, a través de la unión directa a sus promotores (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). Es muy probable que *SOC1* también sea blanco de este complejo, que a su vez regula la expresión de *LFY* (Lagercrantz, 2009; Srikanth y Schmid, 2011; Andrés y Coupland 2012).

Además de *FT*, *CO* también activa la transcripción de *TWIN SISTER OF FT (TSF)* un homólogo de *FT*. Además de *FT*, *TSF* se ha identificado como un nuevo miembro y promotor de la floración que actúa redundantemente con *FT* (Yamaguchi *et al.*, 2005). *TSF* y *FT* comparten patrones de expresión similares en el floema, pero también muestran patrones espaciales diferentes en otros organismos. *TSF* se expresa principalmente en el hipocotilo, mientras que *FT* en cotiledones y hojas. *TSF* y *FT*, actúan de forma independientemente regulando a *LFY* y a *SOC1* (Andrés y Coupland 2012).

### **La vía Autónoma**

Hacia los años 60's Rédei generó con irradiaciones de rayos "X" una serie de mutantes en *Arabidopsis* entre las que identificó a los loci de *co*, *gi*, y *ld*, los cuales están involucrados en la floración. Posteriormente, Koornneef y colaboradores (1991) identificaron otros 11 loci que presentaban un tiempo de floración tardía. Estos loci incluían a los mutantes *fd*, *fwa*, *fe*, *fpa*, *fy*, *fve*, *ft*, *fha*, *fca* y dos loci (*gi* y *co*) identificados por Rédei previamente. La mayoría de las mutaciones eran recesivas y el análisis de las correspondientes mutantes, permitió distinguirlas y clasificarlas de acuerdo a su respuesta para florecer bajo distintos estímulos o condiciones tales como fotoperiodos, vernalización y tratamiento con Giberelinas (GAs) (Langridge, 1957). A través de este escrutinio se identificó a *fca*, *fve*, *fy* y *fpa* como mutantes de floración tardía tanto en día corto como en día largo, y que después de vernalizarlas mostraban una floración normal. Estos genes definieron elementos centrales de lo que ahora denomina la vía autónoma de floración en *A. thaliana*. Por otra parte, mutaciones en *gi*, *co* y *fha*, retrasaban la floración específicamente bajo día largo, sugiriendo que estos genes se

encontraban involucrados en una vía sensible al fotoperiodo largo (Srikanth y Schmid, 2011). Esta vía comprende al grupo de genes *LUMINIDEPENDENS (LD)*, *FCA*, *FY*, *FPA*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, *FVE*, *FLOWERING LOCUS KH DOMAIN (FLK)* y *REF6*, que al ser mutados, producen fenotipos de floración tardía independientemente de la duración del día, pero este fenotipo podía ser rescatado mediante vernalización (Putterill *et al.*, 2004).

Todos los genes de la vía autónoma actúan reprimiendo la expresión de *FLC*, por lo que el fenotipo de floración tardía observado en éstas mutantes en día largo y día corto se explica por un incremento en los niveles de expresión de este gen represor. Los genes de la vía autónoma promueven indirectamente la floración al reprimir la expresión del represor floral *FLC*, particularmente en la ausencia de vernalización (Srikanth y Schmid, 2011). Las proteínas codificadas por los genes de esta vía se encuentran generalmente bajo dos categorías funcionales: 1) remodelación general de la cromatina y 2) proteínas que afectan el procesamiento del RNA (Simpson 2004; Farrona *et al.*, 2008). Estas funciones afectan a diferentes procesos celulares, por lo que algunos mutantes de estos genes pueden presentar fenotipos adicionales a los de la floración tardía. Por ejemplo, Bäurle y colaboradores (2007) mostraron que la doble mutante *fcs fpa* presentaba defectos en el desarrollo de gametofitos femeninos y un desarrollo embrionario temprano (Srikanth y Schmid, 2011).

### **La vía de las Giberelinas**

Las Giberelinas (GAs) son hormonas vegetales que se sintetizan generalmente en las zonas meristemáticas jóvenes (Srivastava, 2002; Taiz, 2006). Las GAs biológicamente activas promueven diversos procesos entre los que se incluyen: la expansión de hojas, elongación del tallo, iniciación floral, desarrollo de los órganos florales, desarrollo de los frutos, y germinación de las semillas y (Davies, 1995). Estas fitohormonas también son 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 activar la expresión de *LFY* (Simpson *et al.*, 1999; Blazquez y Weigel 2000).

El papel de las GAs en la inducción floral se estableció en un principio para las especies bianuales y de día largo, en las cuales, la floración bajo condiciones no inductivas de fotoperiodo se inducían por medio de la aplicación externa de GAs (Mutasa-Göttgen y Hedden, 2009). Los primeros reportes sobre la relación de la GAs en la floración, fueron los de Wilson y colaboradores (1992) quienes encontraron que mutantes en el locus *GA1* presentaban severos retrasos en la floración bajo condiciones no-inductivas de día corto y este retraso era menos severo en condiciones de día largo. La transición al desarrollo reproductivo involucra la división y la elongación celular, las cuales se relacionan directamente con un incremento de las GAs bioactivas en el meristemo apical (Silverston y Sunm 2000; Mutasa-Göttgen y Hedden, 2009).

La transición a la floración vía *CO/FT* inducidos por el fotoperiodo parece dominar en los días largos (Kobayashi y Weigel, 2007; Turck, 2008). Sin embargo, el retraso en la floración observado en la mutante *ga1-3* deficiente de GAs (Wilson *et al.*, 1992) y en la triple mutante *gid1a/gid1b/gid1c* bajo condiciones de luz continua o de día largo, respectivamente, indicaron que las GAs contribuyen a la señalización de *CO* para la promoción de la floración (Griffiths *et al.*, 2006; Mutasa-Göttgen y Hedden, 2009). Datos recientes indican que las GAs podrían estar actuando independientemente de *FT* (Hisamatsu y King, 2008). En días cortos, cuando los niveles de expresión de *FT* son bajos (Wigge *et al.*, 2005), la floración en *Arabidopsis* es completamente dependiente de la señalización por GAs ya que bajo estas condiciones, éstas inducen la expresión de *SOC1* y *LFY* (Wilson *et al.*, 1992; Moon *et al.*, 2003; Hisamatsu y King, 2008; Mutasa-Göttgen y Hedden, 2009).

En algunas especies como *Lolium temulentum* se encontró que las GAs actúan como una señal móvil que transmite un estímulo floral dependiente del

fotoperiodo, mientras que en otras, no parece tener influencia en la inducción floral, si no al contrario en muchas plantas perennes parece inhibir la floración (Mutasa-Göttgen y Hedden, 2009). Por lo tanto, aunque el papel de las GAs en la floración se ha establecido como una de las vías que regulan este proceso, no puede considerársele un estímulo floral universal.

Además de las giberelinas existen otras hormonas involucradas en el crecimiento que pueden promover o inhibir la floración. Un ejemplo es el ácido abscísico (ABA) que retrasa la floración. Al igual que lo hacen en otros procesos del desarrollo de las plantas las fitohormonas GA, y el ABA parecen tener efectos antagonistas en la floración (Taiz y Zeiger, 2006).|

Es importante también señalar que en la búsqueda de genes blanco de algunos genes MADS-box, se encontró que varios genes involucrados en la síntesis o señalización mediada por hormonas son regulados por las proteínas ABC de dominio MADS *AP1*, *AG*, *PI*, *AP3* y *SEP3* (Dornelas *et al*, 2011). De lo anterior se sugiere que existen vínculos regulatorios entre los niveles hormonales y los factores de transcripción MADS-box, resultando en un fuerte control del comportamiento celular dará origen a los órganos florales. Este tipo de interacciones también parece ocurrir en la regulación genético-hormonal del meristemo de la raíz como muestra uno de mis trabajos que integran esta tesis doctoral (Tapia-López, *et al.*, 2008).

### ***La vía de la Vernalización y la regulación de FLC***

Además de la duración del día, la exposición a periodos prolongados de frío (temperaturas de invierno), es una señal importante para guiar a algunas plantas para asegurar que la floración ocurra en primavera. En términos de desarrollo, la vernalización resulta en la adquisición de competencia de los meristemas para llevar a cabo la transición floral. Sin el tratamiento con frío, las plantas que requieren vernalización muestran un retraso notable en la floración o

permanecen en estado vegetativo de forma indefinida. La vernalización en *Arabidopsis* generalmente actúa de forma paralela con la señal del fotoperiodo de día largo (Putterill *et al.*, 2004; Taiz y Zeiger 2006; Dennis y Peacock, 2007).

Existen ecotipos de *Arabidopsis* que crecen en regiones con inviernos largos, los cuales presentan una estrategia reproductiva conocida como ciclo de vida anual de invierno (Taiz y Zeiger, 2006). Estas plantas crecen vegetativamente durante el invierno y requieren de la vernalización para florecer en la primavera y dar semillas en el verano. Por otro lado, existen ecotipos que no requieren vernalización para florecer, aunque este tratamiento siempre lo acelera (Putterill *et al.*, 2004; Dennis y Peacock, 2007). Para que ocurra la vernalización, se requiere de un metabolismo activo durante el tratamiento con frío para proveer de las fuentes de energía necesarias, así como de oxígeno. Además de la activación de los mecanismos de división celular y replicación del DNA.

La manera en la que la vernalización promueve la floración fue confusa por mucho tiempo. A lo largo de varias décadas de estudio sobre este proceso y utilizando diferentes estrategias genéticas, moleculares e inclusive genómicas se llegó a entender mejor. A partir de cruces de plantas de *Arabidopsis* con ciclos de vida anuales de invierno y de verano, se identificó a los genes responsables de conferir el requerimiento a la vernalización. Uno de los genes más importantes en este proceso fue *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, un gen MADS-box y regulador clave en la respuesta a la vernalización, (Sheldon *et al.*, 1999; Michaels, 1999; Dennis y Peacock, 2007). *FLC* es un represor central de la floración que se regula negativamente por la vernalización y por genes de la vía autónoma, además de ser regulado positivamente por el gen *FRIGIDA (FRI)* (Michaels y Amasino 1999; Sheldon *et al.* 1999). *FLC* funciona como un represor que mantiene en estado vegetativo al meristemo apical. El hábito anual de invierno de *Arabidopsis* se establece por la capacidad de *FRIGIDA*, un gen dominante *que* codifica para una proteína trenza anudada o “*coiled-coil*” que promueve altos niveles de expresión de *FLC*, probablemente afectando la estructura de su cromatina (Bastow *et al.*,

2004; Helliwell *et al.*, 2006). La función represora de *FLC* se lleva a cabo en el SAM (Shoot Apical Meristem) y en el tejido vascular, a través de la unión de éste gen a varios sitios blanco como los siguientes: 1) al promotor de *SOC1*, 2) a una región por arriba del inicio de traducción de del gen *FD* y 3) a un sitio dentro del primer intrón del gen *FT* (Putterill *et al.*, 2004; Searle *et al.*, 2006; Helliwell *et al.*, 2006; Dennis y Peacock, 2007). Durante la vernalización, los niveles del RNAm de *FLC* disminuyen, eliminando así la represión sobre la transición a la floración mediada por este gen (Putterill *et al.*, 2004). *FLC* retrasa la floración bloqueando la transcripción de los genes involucrados con la vía del fotoperiodo, por lo que resulta evidente el punto de convergencia con las vía de la vernalización. Análisis recientes del genoma, han mostrado que *FLC* parece unirse a muchos otros genes involucrados en diferentes procesos tales como stress y reguladores de crecimiento (Deng *et al.*, 2011; Andrés y Coupland 2012).

La duración de la exposición al frío ejerce un efecto cuantitativo en el silenciamiento de *FLC*. La reducción del transcrito de *FLC* ocurre progresivamente a lo largo de varias semanas, así que al final del periodo de vernalización, presenta los niveles más bajos de expresión. Este proceso constituye otro más de los finos niveles de regulación de *FLC* y su silenciamiento está relacionado a modificaciones en la cromatina (activa-silenciada) y a RNAs largos no codificantes (RNAslnc). En el caso del silenciamiento de la cromatina de *FLC*, la exposición transitoria al frío induce la expresión de dos tipos de RNAlnc transcritos a partir del mismo locus de *FLC*: *COOLAIR* y *COLDAIR* (Michaels *et al.*, 2003; Shindo *et al.*, 2005). *COOLAIR* es un transcrito no poliadenilado de la clase I y II que se transcribe en antisentido a partir del extremo 3' de *FLC*, y que se sobrelapa con el RNAm de *FLC* (Shindo *et al.*, 2005). La inducción de la transcripción de *COOLAIR* inicia unos días después de que comienza la vernalización, y se ha propuesto que desencadena el silenciamiento de *FLC* por la vernalización (Shindo *et al.*, 2005). *COOLAIR* parece actuar de forma redundante con otros elementos regulatorios codificados en otra región del gen, ya que mutaciones que impiden su transcripción no silencian completamente a *FLC*. Además de *COOLAIR*, existe un

segundo RNAInc no poliadenilado *COLDAIR*, que también participa en el silenciamiento de *FLC* y se induce durante la vernalización (Michaels *et al.*, 2003). *COLDAIR* es un RNA sentido codificado a partir del primer intrón de *FLC* y su expresión depende de un motivo o elemento de respuesta a la vernalización dentro de este intrón. *COLDAIR* no se necesita para reducir la expresión de *FLC* durante la vernalización, pero sí se requiere para silenciar a *FLC* una vez concluida la exposición al frío (Heo y Sung, 2011). Una vez transcrito *COLDAIR* se asocia con *FLC*, para reclutar proteínas involucradas en la formación del Complejo Represor Polycomb 2 (PRC2) (Barner y Grossniklaus, 2012). Entre las proteínas involucradas está CURLY LEAF (CLF), requerida para el silenciamiento estable de *FLC* a través de la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) (De Lucia *et al.*, 2008; Heo y Sung, 2011).

La regulación a nivel post-transcripcional y postraducciona l de la expresión génica también juegan papeles importantes como mecanismos de control de la transición reproductiva. La vernalización tiene dos propiedades notables relacionadas con la regulación epigenética, que involucran cambios estables en la expresión génica sin alterar la secuencia del DNA y estos cambios a su vez. Dichos cambios pueden ser transmitidos a las células descendientes a través de la mitosis o la meiosis. Los cambios epigenéticos ocurren en muchos organismos, desde las levaduras hasta los mamíferos y a menudo requieren de la división celular y la replicación del DNA, como en el caso de la vernalización para ejercer su función (Köhler y Makarevich, 2006; Farrona *et al.*, 2008). El estado de actividad de genes clave en el proceso de floración inducido por las bajas temperaturas es heredado a través de divisiones mitóticas sucesivas, las cuales ocurren durante el desarrollo de la planta hasta que el meristemo apical es transformado en un meristemo reproductivo. La segunda propiedad es que después de la meiosis, los genes de floración son reprimidos en la siguiente generación (Michaels y Amasino, 2000; Dennis y Peacock, 2007; Farrona *et al.*, 2008). Después de la vernalización, *FLC* se apaga epigenéticamente por el resto del tiempo del ciclo de vida de la planta, permitiendo que ocurra la floración en respuesta a los días largos. En la siguiente

generación, *FLC* es nuevamente encendido o activado, restableciéndose así el requerimiento por el frío (Köhler y Makarevich, 2006; Farrona *et al.*, 2008).

En las plantas no vernalizadas, la cromatina de *FLC* se encuentra en una conformación activa, la cromatina se enriquece con modificaciones como la acetilación de las lisinas 9 y 14 de la histona 3 (H3K9 y H3K14) y la metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4), marcas de genes activos. Durante el proceso de vernalización los niveles de esas modificaciones “activas” se reducen, y la cromatina de *FLC* es enriquecida con la metilación de las lisinas 9 y 27 de la histona 3 (H3K9 y H3K27) (Heo y Sung, 2011; Letswaart y Dean, 2012).



## ANTECEDENTES

Una vez que se planteo el modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991) utilizando los mutantes ABC de identidad de órgano en *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, los siguientes esfuerzos se dirigieron a identificar otros miembros de la familia MADS-box, llevando al descubrimiento de genes tales como *AGAMOUS LIKE 12-AGL12* (*XAL1*), *AGL14* (*XAL2*) y *AGL17*, que de acuerdo a ensayos tipo Northern blot se expresaban preferencialmente en la raíz (Rounsley *et al.*, 1995). De forma independiente se identificaron genes de esta familia en otras especies, tal es el caso de NMH7 y NMHC5 (*Medicago truncatula*), involucrados en el desarrollo de nódulos de raíces por infección de *Rhizobium* (Heard y Dunn, 1995; Heard *et al.*, 1997). Posteriormente Zhang y Forde (1998), reportaron a *ANR1*, un gen MADS-box en *A. thaliana* inducido por nitrógeno e involucrado en estimular la elongación de las raíces laterales en respuesta a altas concentraciones de nitratos. Indicando que los genes MADS-box jugaban papeles importantes en otros procesos del desarrollo de la planta y no solamente en el desarrollo de los órganos florales.

Actualmente los genes MADS-box se han encontrado representados en casi todas las especies de angiospermas en las que se les ha buscado tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Kofuji *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2004; Irish, 2006; Soltis *et al.*, 2007b) orquídeas, arroz, maíz, petunia, y en algunas gimnospermas (Thiessen *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2000) involucrados en procesos tan diversos como tiempo de floración, desarrollo de raíz, desarrollo de frutos, de hojas, etc.

*XAANTAL1/XAL1* (At1g71692) originalmente llamado *AGL12* y renombrado así por su fenotipo de floración tardía y raíz corta (xaantal: “que toma más tiempo” en Maya) se ubica en el cromosoma I en el genoma de *Arabidopsis*. Es un gen MADS-box tipo II-MIKC típico (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000), gen hermano de *AGAMOUS* (*AG*). Sin embargo, a diferencia de éste, *XAL1/AGL12* inicialmente se reportó su expresión preponderantemente en la raíz (Rounsley *et al.*, 1995;

Burgeff *et al.*, 2002). Genéticamente *XAL1* presenta una estructura similar a la de *AG*, de 7 exones-6 intrones, y como en *AG*, el segundo intrón es el de mayor tamaño, de 847 pb (Sieburg y Meyerowitz, 1997).

En este trabajo abordamos diferentes enfoques genéticos, fenotípicos, morfológicos y moleculares para entender el papel de los genes MADS-box con especial énfasis en el gen *XAL1/AGL12* en el desarrollo de la raíz y vástago aéreo de *Arabidopsis thaliana*.

## **HIPÓTESIS**

Dados los antecedentes con respecto a los patrones de expresión reportados para el gen *XAL1/AGL12* y la participación de otros genes MADS-box en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, planteamos como hipótesis que éste gen tendrá un papel importante en el desarrollo de la raíz y en las transiciones de los vástagos apicales aéreos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Conocer la función del gen *XAL1/AGL12* en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* mediante el análisis de distintos alelos mutantes de este gen en la raíz y tejidos aéreos.

### **Objetivos Específicos**

- Obtener alelos *mutantes del gen xal1/agl12* a partir de diferentes bancos de mutantes para estudiar el papel que este gen juega en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.
- Genotipificar y evaluar los fenotipos en la raíz de la mutante *xal1/agl12* a través de la cuantificación celular del meristemo de la raíz.
- Analizar los patrones de expresión de *XAL1/AGL12* a través de la generación y análisis de líneas reporteras con una fusión transcripcional entre la región promotora de *XAL1/AGL12* y los genes reporteros *GFP* y *GUS*.
- Determinar si las auxinas afectan la expresión de *XAL1/AGL12* en la raíz, utilizando diferentes tratamientos con auxinas de las líneas reporteras de la expresión de *XAL1/AGL12*.

- Describir el fenotipo aéreo de *xal1* mediante la cuantificación del tiempo de floración en plantas con los alelos mutantes en comparación con líneas silvestres.
- Corroborar la expresión de *XAL1/AGL12* en el SAM y en tal caso, determinar el papel de este gen en la vías genéticas que regulan la floración.
- Generar líneas de sobre-expresión de *XAL1* para evaluar la suficiencia de la función de *XAL1/AGL12* en el RAM y el SAM.

## RESULTADOS

Los resultados derivados de mi trabajo doctoral se presentan en las siguientes dos capítulos, con las publicaciones correspondientes.

## CAPITULO I

**Caroline Burgeff, Sarah J. Liljegren, Rosalinda Tapia-López, Martin F. Yanofsky, Elena R. Alvarez-Buylla.** (2002). MADS-box gene expression in lateral primordial, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **214**:365-372

Los genes MADS-box han sido involucrados y bien caracterizados en el desarrollo de la flor y del fruto. Sin embargo, la función de este tipo de genes que se expresan en tejidos vegetativos aún deben explorarse. Al menos siete miembros de esta familia se agrupan en clados de genes que se expresan preferencialmente en la raíz de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Rounsley et al., 1995; Zhang y Forde 1998). En el artículo anexo se reporta la clonación del gen MADS-box *AGL21*, que pertenece al clado de *ANR1*, así como el patrón de expresión por hibridación *in situ* del ARNm de este gen (*AGL21*) y otros dos genes MADS-box de raíz. El gen *AGL17* se expresa principalmente en la cofia lateral, en las células de la epidermis y en la zona de elongación. *AGL21* presenta una elevada expresión en los primordios de las raíces laterales y en el meristemo de la raíz primaria cuyo patrón de expresión es de forma puntuada. *AGL12* y *AGL21* se expresan fuertemente en el cilindro central de las raíces y en embriones en desarrollo. *AGL12*, además presenta también un patrón de expresión de forma puntuada en el meristemo de la raíz primaria y se reporta su expresión en atricoblastos. Este estudio, combinado con análisis filogenéticos previos, indican que estos genes MADS-box podrían jugar distintos papeles reguladores durante el desarrollo de la raíz.

Caroline Burgeff · Sarah J. Liljegren  
Rosalinda Tapia-López · Martin F. Yanofsky  
Elena R. Alvarez-Buylla

## MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots

Received: 8 April 2001 / Accepted: 2 May 2001 / Published online: 4 September 2001  
© Springer-Verlag 2001

**Abstract** Although MADS-box genes involved in flower and fruit development have been well characterized, the function of MADS-box genes expressed in vegetative structures has yet to be explored. At least seven members of this family are grouped in clades of genes that are preferentially expressed in roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. We report here the cloning of the *AGL21* MADS-box gene, which belongs to the *ANRI* clade, and the mRNA in situ expression patterns of this and two other root MADS-box genes. *AGL17* appears to be a lateral root cap marker in the root tip, and towards the elongation zone this gene is expressed in the epidermal cells. *AGL21* is highly expressed in lateral root primordia and it has a punctate expression pattern in the primary root meristem. *AGL12* also has a punctate expression pattern in the primary root meristem. *AGL12* and *AGL21* are also expressed in the central cylinder of differentiated roots and both are expressed in developing embryos. This study, combined with previous phylogenetic analyses, indicates that these MADS-box genes may play distinct regulatory roles during root development.

**Keywords** *Arabidopsis* · *ANRI* · Embryo development · Lateral root primordium · MADS-box · Root (MADS-box genes)

**Abbreviations** LRC: lateral root cap · LRP: lateral root primordium · RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction

C. Burgeff · R. Tapia-López · E.R. Alvarez-Buylla (✉)  
Instituto de Ecología, UNAM, AP-Postal 70-275,  
México D.F. 04510, México  
E-mail: abuylla@servidor.unam.mx  
Fax: +52-5-6161976

S.J. Liljegren · M.F. Yanofsky  
Department of Biology, UCSD,  
La Jolla, CA 92093-0116, USA

### Introduction

MADS-box genes play important functional roles in eukaryotes (Riechmann and Meyerowitz 1997; Black and Olson 1998; Theissen et al. 2000). In plants, members of this family of transcription factors are involved in flower and fruit development in aspects such as meristem and flower organ identity determination, silique development, as well as flowering initiation (Riechmann and Meyerowitz 1997; Ferrándiz et al. 1999; Sheldon et al. 1999; Lee et al. 2000; Pelaz et al. 2000). Phylogenetic analyses have shown that MADS-box genes form monophyletic groups of genes specifically expressed in reproductive structures (Purugganan et al. 1995; Theissen et al. 1996) and more recent analyses show that, in *Arabidopsis*, MADS-box genes expressed in vegetative structures also group in distinct clades (Alvarez-Buylla et al. 2000b). These results suggest that MADS-box genes could be involved in the regulation of the development of vegetative structures. However, very little is known about the function of vegetatively expressed MADS-box genes, of which several are preferentially expressed in the *Arabidopsis* root (Alvarez-Buylla et al. 2000a).

The anatomical simplicity, small size and transparency of the *Arabidopsis* root have made it a model for studies on plant organogenesis (Benfey and Schiefelbein 1994). In the root tip of *Arabidopsis*, three successive but overlapping regions have been distinguished (Dolan et al. 1993). The root meristem or proliferative zone consists of actively dividing cells and is located at the distal end of the root tip. Behind the meristem, cells expand longitudinally to constitute the elongation zone and, finally, cells progressively attain their fully mature stage in the differentiation zone. In cross-section, the root presents a radial pattern of single concentric tissue layers. At the root meristem these are delimited by the lateral root cap (LRC) that surrounds the epidermis, the cortex and the endodermis, which, in turn, encircle the central cylinder or stele consisting of a pericycle and a vascular bundle

(Dolan et al. 1993). All root tissues are derived from a set of initial cells that surround the quiescent center and together constitute the promeristem (Clowes 1954). This is the minimal construction center of the root and is located towards the root tip, which is distally protected by actively dividing and exfoliating columella root cap cells.

Laser ablation experiments have established the importance of cell position and short-range signaling during cell-fate determination (van den Berg et al. 1995, 1997). Several developmental root mutants have been characterized and some of the genes underlying these mutations have been functionally analyzed and studied at the molecular level (e.g. Di Laurenzio et al. 1996; Masucci et al. 1996; reviewed by Scheres and Heidstra 1999). This is particularly true for the genes controlling sub-differentiation of the root epidermis (reviewed by Schiefelbein 2000). However, much more work is still needed in order to uncover the molecular mechanisms that underlie root development.

Recently identified root MADS-box genes are likely to become important molecular tools with which to continue exploring the transcriptional networks controlling root development (Alvarez-Buylla et al. 2000a). A root MADS-box gene, *ANRI*, seems to mediate nitrate-induced lateral root growth stimulation (Zhang and Forde 1998). However, no MADS-box gene has been identified in previous mutant screens. This could be due to overlapping functions among members of this family (e.g. Liljegen et al. 2000; Pelaz et al. 2000; Smyth 2000), but lethality and subtle phenotypes that are hard to score under standard growth conditions should not be excluded. In this context, we have decided to explore the role of MADS-box genes in root development with a reverse genetic approach, starting with the analysis of mRNA expression patterns.

Based on the studies of the MADS-box genes thus far characterized at the functional level (e.g. Yanofsky et al. 1990; Mandel et al. 1992; Riechmann and Meyerowitz 1997; Liljegen et al. 2000), it is reasonable to propose the hypothesis that expression patterns of members of this gene family are a good guide of where they likely function. In fact, some of these genes were first characterized at the expression level, and, based on these data, it was possible to predict their function. Only later was it genetically proven that they indeed act when and where they had previously been shown to be expressed (e.g. Liljegen et al. 2000; Pelaz et al. 2000 and references therein). Therefore, expression patterns and phylogenetic analyses of these genes will likely become guidelines for identifying redundant groups and directing genetic and further functional analyses (e.g. Rounsley et al. 1995; Liljegen et al. 2000; Molin et al. 2000).

We report here the cloning of *AGL21*, a new MADS-box gene, and the mRNA in situ expression patterns of this and two other root MADS-box genes, *AGL17* and *AGL12*, in roots and embryos of *Arabidopsis*. We use the mRNA expression patterns reported here to advance preliminary hypotheses on their functions and, together with previous phylogenetic reconstructions, to evaluate

the possible redundant groups and hence guide genetic analyses.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

For root in situ analyses, seeds of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Columbia ecotype (Col), were surface-sterilized for 2 min in 70% ethanol, and 20 min in 5% sodium hypochlorite, 1% SDS. After rinsing and re-suspending in 0.1% tissue culture agar (TC agar; Carolina Biological Supply Co.), the seeds were vernalized for 2 days at 4 °C. Seeds were put on 1× MS (Sigma M0404) agar medium (1% saccharose, pH 5.7) in petri dishes held in a vertical position in a plant growth chamber (Lab-line Bionette) with continuous light at 22 °C. Landsberg *erecta* (Ler) and Col plants grown in soil were vernalized after sowing and held in a growth chamber at 22–24 °C under either continuous light or a 16 h light/8 h dark regime.

### *AGL21* cloning and sequence determination

Using Ler genomic DNA as a template, the *AGL21* MADS-box region was amplified with the MADS-1 and MADS-43 degenerate PCR oligonucleotides as previously described (Rounsley et al. 1995). The following nested oligonucleotides SL3-1 (5'-TGTGATCCAAAGGATCGATG-3') and SL3-2 (5'-GATGATTCAACGAGTAGACA-3') were then used with oligo (dT) to amplify the 3' end of the *AGL21* cDNA from root tissue, using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The 5'-region of the *AGL21* MADS-box domain was obtained through TAIL (Thermal Asymmetric Interlaced) PCR performed as previously described (Tsugeki et al. 1996). *AGL21*-specific nested oligonucleotides (5'-GCAAAGTCATAGAGCTTTCCGGT-3') and (5'-GATGAGACCGACCTCGGCATCAC-3'), were used in successive rounds with the following degenerate primer (5'-(A/G/C/T)TCGA(C/G)T(A/T)T(C/G)G(A/T)GTT-3'). The complete coding sequence of the gene was amplified by RT-PCR from root cDNA using the oligonucleotides CB15F (5'-CGGATCCAATGGGAAGAGGGAAGATTGT-3') and CB16R (5'-CGGATCCTTATTCGTTTGCTCTTGGTG-3'). The cloning and subcloning vectors used were: Bluescript (Stratagene) and PGEMT (Promega). Sequence analysis and edition was done using GeneWorks and MacVector computer programs.

### *AGL21* mapping

*AGL21* was initially mapped by PCR using three-dimensional YAC pools of the CIC library (Creusot et al. 1995; *Arabidopsis* Biological Resource Center, <http://aims.cps.msu.edu/aims/>). Afterwards, map position was confirmed by genomic sequencing information.

### RNA blot analysis

Total RNA was extracted from various Ler plant tissues as previously described (Rounsley et al. 1995). The *AGL21* probe was synthesized from a 578-bp *EcoRI* fragment of pSL73 and is specific for the 3'-region of the gene. RNA loading controls were performed as in Rounsley et al. (1995).

### In situ hybridization

The roots of plants grown on MS agar plates for 7–14 days were fixed in 4% paraformaldehyde, vacuum-infiltrated and kept overnight at 4 °C. Siliques of soil-grown plants were fixed overnight in FAE solution (ethanol: acetic acid:formaldehyde:water,



50:5:3.5:41.5, by vol.). Samples were then dehydrated through an ethanol series, passed through an ethanol:HistoClear (National Diagnostics) series and embedded in Paraplast+ (Oxford Labware). Microtome sections (9  $\mu$ m) of the samples were mounted on Probe-On Plus Slides (Fisher Scientific). Roots used in whole-mount in situ experiments were fixed as described above and kept refrigerated in 70% ethanol until in situ hybridization. Afterwards, the root tips were pre-embedded in agarose (1%), then embedded in Paraplast+ and transversally sectioned (technical details concerning root manipulation prior to sectioning are available upon request).

Digoxigenin-labeled probes were synthesized following the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim) and hydrolyzed to an average length of 200 bp. Probes were chosen to avoid the presence of the MADS-box sequence. The antisense probe for *AGL12* was synthesized with the T7 RNA polymerase from an *Xba*I-linearized pSR103 plasmid, consisting of a 266-bp fragment of the 3' UTR (untranscribed region) of the cDNA. For *AGL17*, a probe consisting of 430 bp of the 3' region of the cDNA was synthesized with T7 RNA polymerase over a *Bam*HI-linearized pSR192 clone that contains the *Eco*RI 3'-end fragment of the cDNA. The antisense probe for *AGL21* was obtained with T3 RNA polymerase from the *Kpn*I-linearized plasmid pSL215. This plasmid contains the 578-bp *Eco*RI 3'-end fragment of the cDNA. For all the genes studied and in all experiments performed for different tissues, sense probes were used as negative controls. Pre-hybridization, hybridization, washes and detection conditions followed Ferrández et al. (2000), with minor modifications: the proteinase K concentration was 0.5  $\mu$ g/ml; hybridization and 2 $\times$ SSC/50% formamide washes were done at 50  $^{\circ}$ C.

#### Microscopy and image analysis

Photographs were taken using a Nikon Labophot2 MT or an Olympus BX 60 microscope with Nomarski optics. Slides were scanned using Nikon SF200 scanner and Nikon Scan 2.1 software. Images were processed using Adobe Photoshop 5.0.

## Results

### *AGL21* cloning and sequence determination

In an effort to uncover additional root-specific MADS-box genes, a PCR-based approach (Rounsley et al. 1995; Alvarez-Buylla et al. 2000b) was used to clone additional members of the MADS-box gene family. *AGL21* cDNA has an open reading frame of 228 amino acids (Genbank accession number AF336979). The putatively encoded protein contains a 58-amino-acid MADS domain at the N-terminus, followed by a 31-amino-acid I-domain, a 64-amino-acid K-domain, and a 75-amino-acid C-terminus domain, with the typical structure of Type-II plant MADS-box genes (see also Alvarez-Buylla et al. 2000a, b).

*AGL21* was found in the YAC CIC 6C9, positioned on chromosome 4, (<http://www.Arabidopsis.org>) (accession number AL035538 for BAC F20D10).

### *AGL21* is primarily expressed during lateral root formation and embryogenesis

RNA blot analysis detected *AGL21* expression in roots, while the transcript was not detected in leaves, stems, flowers or siliques (Fig. 1). However, RT-PCR analyses revealed a clear expression of this gene in siliques as well as roots (data not shown). To obtain a more detailed

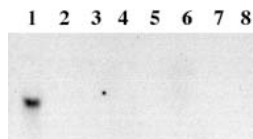
pattern of expression, in situ hybridization experiments were performed.

mRNA in situ hybridization experiments detected *AGL21* expression at high levels during lateral root formation, from young lateral root primordia (LRPs) of about three to four cell layers, up to lateral root emergence, when labeling was mostly confined to the apex (Fig. 2a, b). We were not able to detect transcripts of this gene in younger LRPs. As the lateral root started to grow, the gene continued to be expressed mainly in the proliferative region, gradually adopting a punctate pattern. *AGL21* transcripts were also found in the LRPs that developed near the hypocotyl-root junction (Fig. 2c). This gene was expressed at relatively lower levels in the primary meristem of the roots where only some cells were labeled in a punctate pattern, although some sections showed a higher proportion of stained cells (Fig. 2d, e). In the differentiated zone of the root, *AGL21* was observed in the central cylinder. Staining intensity varied along the root length and in some cases higher labeling could be seen in the pericycle cells (results not shown).

The presence of *AGL21* mRNA during LRP development led us to investigate whether this and other root MADS-box genes are expressed during root formation in embryos. In situ experiments showed that *AGL21* is also present in embryos at least from the globular stage up to the torpedo stage (Fig. 2g–i). During these stages the labeling sometimes showed an increasing gradient from the basal to the apical pole of the embryo (Fig. 2g, i). Preliminary data showed that *ANR1* had an overall similar expression pattern to that of *AGL21* in roots and embryos (data not shown) in plants grown in our conditions (see *Materials and methods*).

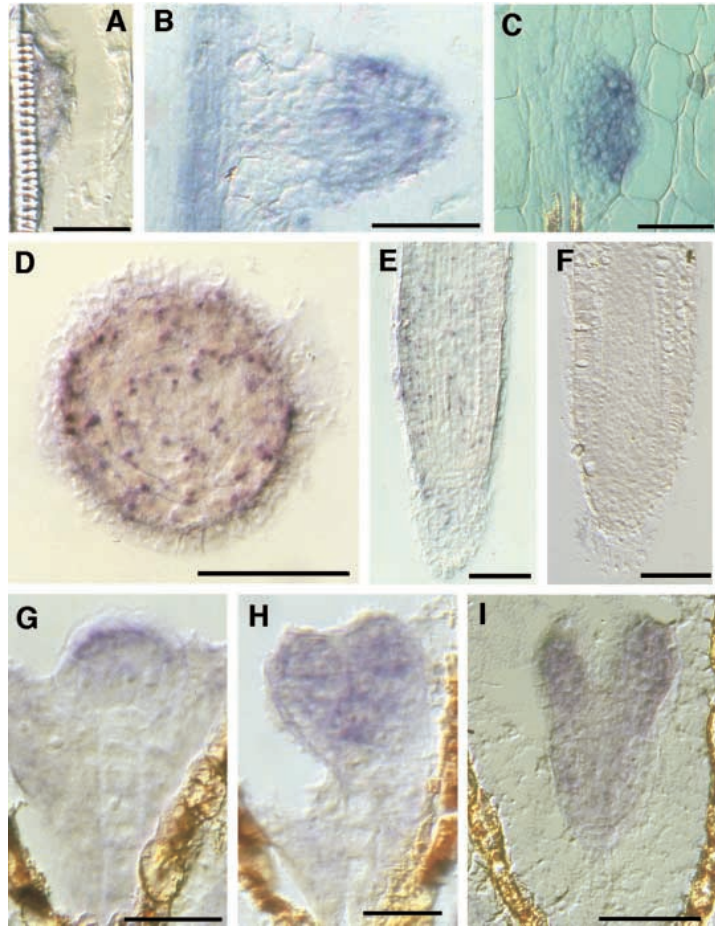
### *AGL17* mRNA is specific to the LRC and epidermis of root tips

*AGL17* was specifically expressed in the LRC along the root meristem (Fig. 3a, c). Once the LRC disappeared close to the limit of the proliferative zone, this gene was expressed in the epidermis (Fig. 3a, f). Whole-mount in situ hybridization of root tips subsequently embedded and transversally sectioned was used to confirm the latter pattern (Fig. 3e, f). Some of the signal observed in Fig. 3f might belong to collapsed LRC cells overlying



**Fig. 1** mRNA gel blot hybridization of *AGL21* from *Arabidopsis thaliana*. A gene-specific probe was used and equal RNA loading was tested with a tubulin probe. Lanes: 1 roots, 2 leaves, 3 stems, 4 flowers, 5 young siliques, 6 old siliques, 7 3-day-old seedlings, 8 8-day-old seedlings

**Fig. 2a–i** Pattern of mRNA expression of *AGL21* in roots and embryos of *A. thaliana*. In situ hybridization of digoxigenin-labeled probes is shown. **a–c** Antisense probe hybridizations of longitudinal sections of a young LRP (**a**), an emergent LRP (**b**), and an LRP at a hypocotyl-root junction (**c**). **d, e** Antisense probe hybridizations of transverse (**d**) and longitudinal (**e**) sections of a primary root meristem. **f** Sense probe hybridization of a longitudinal section of a primary root meristem. **g–i** Antisense probe hybridizations of longitudinal sections of embryos at the globular (**g**), late triangular (**h**) and torpedo (**i**) stages. Bars = 50  $\mu\text{m}$  (**b–f, i**), 25  $\mu\text{m}$  (**a, g, h**)



the epidermis. However, careful observation of the pattern of labeled cells along successive sections (results not shown), as well as the labeling of the cells along the anticlinal walls of the epidermis support the possibility that the signal is actually present in the epidermis. In some cases, *AGL17* expression was observed in files of central cylinder cells that seemed to be pericycle cells in the early elongation zone of longitudinal sections. In the differentiation zone, *AGL17* was observed in the pericycle and at very low levels in other central cylinder cells (results not shown). We could not detect *AGL17* mRNA during LRP formation or during embryogenesis at least up to the late heart stage.

*AGL12* transcripts are present in the meristem and in the central cylinder of the mature root

In root meristems this gene was mainly expressed in the external cells of the columella and in the LRC. Most

sections also showed staining in all tissue types but with a punctate pattern, similar to that observed for *AGL21* (Fig. 4a, c). However, in transverse sections towards the basal end of the proliferative zone, *AGL12* transcripts were preferentially expressed in atrichoblasts rather than in trichoblasts (Fig. 4a). In longitudinal sections of differentiated roots, *AGL12* was highly expressed in the central cylinder (Fig. 4e). Staining intensity varied along the root length and in some cases a more intense labeling was observed in pericycle cells (results not shown). We did not detect the transcript in LRPs but once lateral roots were formed, we found the same pattern of expression as in the primary root meristem. *AGL12* was also expressed in a punctate pattern from the globular stage to at least the torpedo stage of embryogenesis, with the frequency of stained cells increasing as embryogenesis proceeded (Fig. 4d). RT-PCR experiments corroborated the presence of *AGL12* transcript during silique development (results not shown).

also expressed in embryos. Based only on pair-wise sequence percentage identity at the amino acid level, we would expect that *AGL17* and *AGL21* have the greatest possibility of being functionally redundant. *AGL21* shares with *AGL17* amino acid sequence identities of 73.4% for the complete protein sequence and 77.1% for the MADS I- and K-domains sequence. The rest of the pair-wise comparisons for the genes in the same clade yielded identity percentages below 60%, suggesting less chance of functional redundancy between genes within a pair.

In contrast to the sequence comparison data, our expression data show that *AGL17* and *AGL21* have contrasting mRNA expression patterns, suggesting that these two genes are not functionally redundant. On the other hand, preliminary results show that similar expression patterns exist in roots between *AGL17* and *AGL16*, as well as between *AGL21* and *ANR1* (data not shown). These data suggest that possible functional redundancy may be present within gene pairs of this clade, although not strictly between the most recently duplicated genes. In *Caenorhabditis*, a case of functional redundancy has been recently reported between two genes of the forkhead transcription factors family that show similar expression patterns but which have more sequence divergence between each other than with respect to other family members (Molin et al. 2000).

We detected *AGL21* mRNA during lateral root formation in LRPs starting at stages III or IV (Malamy and Benfey 1997) and up to when the root had emerged. At this stage the expression was confined to the apex, presumably in the region where cells actively proliferate. We cannot rule out expression in earlier stages, because we were not able to observe younger primordia. These results suggest an association of this gene with regions of cells that maintain proliferative potential.

Once a lateral root meristem has formed, the expression pattern of *AGL21* is restricted to the proliferative zone and as the root elongates it becomes punctate and less intense. A similar punctate pattern was also observed in the primary root meristem where the number of stained cells varied among experiments, as exemplified by the longitudinal and transverse sections shown in Fig. 2d, e. Similar punctate mRNA and protein patterns have been reported in plants for cell-cycle related genes, such as cyclins, histones and some *cdc2*-like genes (Ferreira et al. 1994; Fobert et al. 1994). In roots, *ANR1* appears to be involved in lateral root growth stimulation in response to higher local concentrations of nitrates. This suggestion was derived from antisense and co-suppression lines (Zhang and Forde 1998). Nitrate-induced lateral root growth seems to be associated with changes in the rate of cell production rather than with changes in cell elongation (Zhang et al. 1999). It will be interesting to test if *AGL21* and *ANR1* have similar roles. Interestingly, our preliminary data on the mRNA pattern for *ANR1* show that this gene is also expressed in the LRPs (data not shown).

*AGL21* is also expressed during embryo development, at least from the octant-globular to the late heart-torpedo stages, as assessed by in situ and RT-PCR experiments. The inability to detect its presence in siliques by RNA blot analysis might be due to the fact that the gene expression level in these structures could be below the detection limits of this technique. In about 70% of the cases, a higher staining level is present in the apical region of the embryo and sometimes it is not clearly seen in the embryonic root, suggesting that *AGL21* may not be continuously expressed during embryo root formation. This pattern suggests that this gene transcription could be associated with the onset of high cell production, which, in the apical region of the embryo, leads to cotyledon formation, or it could indicate that *AGL21* is involved in different genetic circuits during embryogenesis and root post-embryonic development.

*AGL17* is expressed in the LRC and the epidermis. Overall, our careful examination of successive sections suggests that *AGL17* is indeed expressed in the epidermis from the end of the meristem up to the elongation zone. However, in whole-mount, in situ hybridizations, the epidermal staining, which at this level is mainly seen towards the cell walls, could be interpreted as background (Fig. 3f). But no such signal was observed in the sense controls at this level (data not shown), rather suggesting then, that such cellular localization of the signal could be due to cell vacuolisation in the incipient elongating cells in which the cytoplasm is displaced towards the cell margins.

The root cap and the epidermis seem to play fundamental roles in sensing external stimuli and in the basipetal redistribution of auxin, respectively, affecting root growth and morphogenesis (e.g. Müller et al. 1998; Tsugeki and Fedoroff 1999). From the end of the proliferative zone up to the elongation zone, *AGL17* is expressed in the epidermis. In this zone, the fixation of cell-fate determination and the differential cell elongation during gravitropic response take place (Masson 1995; Berger et al. 1998). Additionally, this zone includes the region where the cells in a file cease proliferation, defining the basal end of the meristematic zone. One would expect that important controls affecting root growth plasticity occur around this zone, because the total number of proliferating cells per file in the meristem has a direct impact on the total root growth rate (Beemster and Baskin 1998). Alternatively, it could be hypothesized that *AGL17* may be involved in LRC cell specification in the root. However, the radial organization of the root is laid down during embryogenesis (Scheres 1996), and this gene is neither expressed in the late heart stage of the embryo, at the end of which the formation of an LRC layer by the epidermal initials is often viewed as the onset of root meristematic activity, nor in the LRC of young emergent LRPs when LRC molecular markers are already expressed (Dolan et al. 1993; Scheres et al. 1994; Malamy and Benfey 1997). Our data suggest, then, that this gene is not likely to be involved in the early stages of cell fate specification in the LRC.

- Scheres B, Heidstra R (1999) Digging out roots: pattern formation, cell division, and morphogenesis in plants. *Curr Top Dev Biol* 45:207–247
- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and meristem initials. *Development* 120:2475–2487
- Schiefelbein JW (2000) Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiol* 124:1525–1531
- Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES (1999) The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* 11:445–458
- Smyth D (2000) A reverse trend-MADS functions revealed. *Trends Plant Sci* 5:315–317
- Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, Münster T, Winter KU, Saedler H (2000) A short story of MADS-box genes in plants. *Plant Mol Biol* 42:115–149
- Theissen G, Kim JT, 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
- Tsugeki R, Fedoroff NV (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12941–12946
- Tsugeki R, Kochieva EZ, Fedoroff NV (1996) A transposon insertion in the *Arabidopsis* SSR16 gene causes an embryo-defective lethal mutation. *Plant J* 10:479–489
- van den Berg C, Willemsen V, Hage W, Weisbeek, Scheres B (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 378:62–65
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390:287–289
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346:35–39
- Zhang H, Forde BG (1998) An *Arabidopsis* MADS-Box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279:407–409
- Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG (1999) Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6529–6534

## CAPITULO II

Este trabajo, representa la parte sustancial de mi tesis.

**Rosalinda Tapia-López, Berenice Gacía-Ponce, Joseph G. Dubrovsky, Adriana garay-Arroyo, Rigoberto V. Pérez-Ruíz, Sun-Hyung Kim, Francisca Acevedo, Soraya Pelaz y Elena R. Alvarez-Buylla.** (2008). An *AGAMOUS*-Related MADS-box gene, *XAL1 (AGL12)*, regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**:1182-1192.

# An *AGAMOUS*-Related MADS-Box Gene, *XAL1* (*AGL12*), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in *Arabidopsis*<sup>1[W][OA]</sup>

Rosalinda Tapia-López<sup>2</sup>, Berenice García-Ponce<sup>2</sup>, Joseph G. Dubrovsky, Adriana Garay-Arroyo, Rigoberto V. Pérez-Ruíz, Sun-Hyung Kim<sup>3</sup>, Francisca Acevedo<sup>4</sup>, Soraya Pelaz, and Elena R. Alvarez-Buylla\*

Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México D.F. 04510, Mexico (R.T.-L., B.G.-P., A.G.-A., R.V.P.-R., S.-H.K., F.A., E.R.A.-B.); Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México (J.G.D.); and ICREA and LGMV (Institutió Catalana de Recerca i Estudis Avançats y Laboratori de Genética Molecular Vegetal, CSIC-IRTA), IBMB-CSIC C, 08034 Barcelona, Spain (S.P.)

MADS-box genes are key components of the networks that control the transition to flowering and flower development, but their role in vegetative development is poorly understood. This article shows that the sister gene of the *AGAMOUS* (*AG*) clade, *AGL12*, has an important role in root development as well as in flowering transition. We isolated three mutant alleles for *AGL12*, which is renamed here as *XAANTALI* (*XAL1*): Two alleles, *xal1-1* and *xal1-2*, are in Columbia ecotype and *xal1-3* is in Landsberg *erecta* ecotype. All alleles have a short-root phenotype with a smaller meristem, lower rate of cell production, and abnormal root apical meristem organization. Interestingly, we also encountered a significantly longer cell cycle in the strongest *xal1* alleles with respect to wild-type plants. Expression analyses confirmed the presence of *XAL1* transcripts in roots, particularly in the phloem. Moreover, *XAL1::β-glucuronidase* expression was specifically up-regulated by auxins in this tissue. In addition, mRNA in situ hybridization showed that *XAL1* transcripts were also found in leaves and floral meristems of wild-type plants. This expression correlates with the late-flowering phenotypes of the *xal1* mutants grown under long days. Transcript expression analysis suggests that *XAL1* is an upstream regulator of *SOC*, *FLOWERING LOCUS T*, and *LFY*. We propose that *XAL1* may have similar roles in both root and aerial meristems that could explain the *xal1* late-flowering phenotype.

<sup>1</sup> This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (grant nos. CO1.41848/A-1, CO1.0538/A-1, and CO1.0435.B-1); Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM; grant nos. IN230002 and IX207104); and the University of California-MEXUS ECO IE 271 to E.R.A.-B. R.T.-L. was a recipient of CONACYT and DGAPA-PAPIIT-UNAM fellowships (no. IX225304). J.G.D. was supported by DGAPA-PAPIIT-UNAM (grant nos. IN210202 and IN225906) and CONACYT (grant no. 49267).

<sup>2</sup> These authors contributed equally to the article.

<sup>3</sup> Present address: Department of Environmental Horticulture, University of Seoul, 90 jeonong-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-743, Korea.

<sup>4</sup> Present address: Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad, Liga Periférico-Insurgentes Sur 4903, Col. Parques del Pedregal, Tlalpan, CP.14010 Mexico D.F., Mexico.

\* Corresponding author; e-mail eabuylla@gmail.com.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Elena R. Alvarez-Buylla (eabuylla@gmail.com).

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

<sup>[OA]</sup> Open Access articles can be viewed online without a subscription.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.108647](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.108647)

Normal morphogenesis depends on the equilibrium between cell proliferation and differentiation (i.e. cellular homeostasis), whereas transcriptional regulatory networks reliably translate genetic information to yield specific and complex multicellular patterning. In both animals and plants, elegant models of pattern formation have suggested the existence of mechanisms that determine developmental identities in precise manners (Coen and Meyerowitz, 1991; Lawrence and Morata, 1994). Dynamic regulatory network models have substantiated the existence of these mechanisms (von Dassow and Odell, 2002; Espinosa-Soto et al., 2004). Only recently, molecular links between mechanisms that underlie cell-type specification and cell-cycle regulation have been demonstrated (Caro et al., 2007).

The MADS-box gene family encodes a large variety of transcriptional regulators of plant and animal development (Messenguy and Dubois, 2003). These transcription factors have been classified into two classes based on sequence relationships and structural features (type I and II lineages) that should have derived from at least one ancestral duplication before the divergence of animals and plants (Alvarez-Buylla et al., 2000b). Therefore, plant type I is closely related to the animal SRF factors, whereas plant type II is more similar to the MEF type of animals in their MADS domains than to

plant type I. However, type II MADS-domain proteins of plants have three domains (I, K, C) in addition to the MADS DNA-binding domain: a small I domain that links the MADS with the dimerization K domain and the COOH domain (Riechmann and Meyerowitz, 1997).

Plant MIKC genes have been mostly characterized as regulators of the transition to flowering (Samach et al., 2000) and flower, fruit, and seed development (Bowman et al., 1991; Gu et al., 1998; Ferrandiz et al., 2000; Nesi et al., 2002; Pinyopich et al., 2003). They are fairly specific meristem- (Mandel et al., 1992; Bowman et al., 1993), cell- (Liljegren et al., 2000), or organ-identity (Yanofsky et al., 1990; Pelaz et al., 2000) genes. However, genome-wide studies suggest that most MADS-box genes are expressed at different stages of the plant's life cycle and in a variety of organs and cell types (Kofuji et al., 2003; for review, see Rijpkema et al., 2007), suggesting that these genes may have developmental roles that affect multiple tissues and organs.

Given the high sequence conservation of MADS domains of plant and animal proteins within each lineage (I and II), we hypothesized that some of their functions may also have been conserved. Animal MEF-related MADS proteins have been implicated in regulation of cellular homeostasis and linked to cell-cycle control (Lazaro et al., 2002). Therefore, we proposed that some plant MIKC genes might be important modulators of cell proliferation versus differentiation decisions. Moreover, quantitative cellular analyses of MADS-box mutants may help to further understand the role of these genes in various plant developmental processes.

We have focused on MADS-box genes expressed in the root because this organ is transparent and simple at the cellular level, enabling quantitative analyses of cell dynamics (Dolan et al., 1993; Malamy and Benfey, 1997). Indeed, the root has become a very useful system for unraveling general features of multicellular developmental mechanisms (Benfey and Scheres, 2000; Chapman et al., 2003; Wildwater et al., 2005), and specifically for understanding the links between cellular dynamics and cell-type specification during normal morphogenesis of a complex organ in vivo (Sabatini et al., 2003; Wildwater et al., 2005; Caro et al., 2007). Some components of the molecular mechanisms involved in stem-cell niche patterning and behavior (Sablowski, 2004a; Sarkar et al., 2007), as well as in the patterns of cell proliferation along morphogenetic gradients, which in the root are importantly determined by auxins, have been characterized (Sabatini et al., 1999; Galinha et al., 2007; Grieneisen et al., 2007).

In this study, we report the characterization of *AGL12* based on three alleles (two in the Columbia [Col] background and one in the Landsberg *erecta* [*Ler*] background) that we have named *xaantal1* (*xal1*) due to its short-root and late-flowering phenotypes (*xaantal*: "to take longer" in Mayan), thus also renaming the *AGL12* gene *XAL1*. *XAL1* is the sister gene to the *AGAMOUS* (*AG*)-related genes that are specific for

reproductive tissues. In contrast, *XAL1* was characterized as a root-specific gene (Rounsley et al., 1995). Here, we confirm that *XAL1* is indeed expressed in roots, but we report its expression also in aerial organs. Our data suggest that *XAL1* is an important regulator of cell proliferation in the root. *XAL1* mutant alleles have short roots with an altered cell production rate, meristem size, and cell-cycle duration, and thus *XAL1* is the first MADS-box gene that is shown to be involved in cell-cycle regulation. Auxins have been implicated in cell-cycle regulation (Himanen et al., 2002; Vanneste et al., 2005) and our data interestingly show that *XAL1* is induced by auxins. On the other hand, *xal1* alleles are also late flowering and our data suggest that *XAL1* could be an important promoter of the flowering transition through up-regulation of *SOC*, *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), and *LFY*.

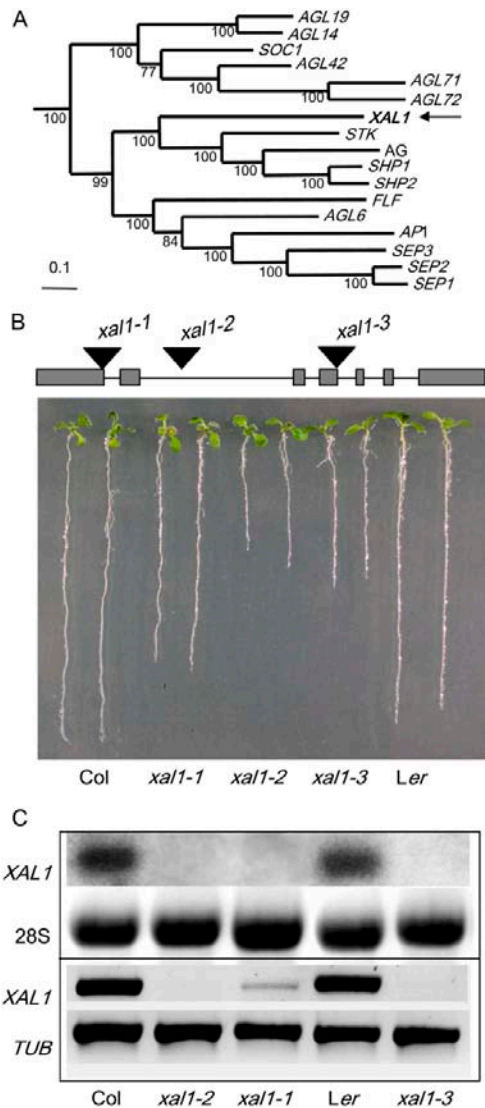
## RESULTS

### *XAL1*, a Sister Gene of the *AGAMOUS* MADS-Box Clade, Is an Important Regulator of Root Development

Sequence analysis of *XAL1* indicated that this gene is a member of the MADS-box transcription factor family (Fig. 1A) and recent phylogenetic analyses suggested that *XAL1* is sister to the rest of the *AG*-related genes (Martínez-Castilla and Alvarez-Buylla, 2003; Parenicová et al., 2003). However, contrary to the other members of the *AG* clade, the expression of *XAL1* is not restricted to reproductive organs because it is strongly expressed in roots (Rounsley et al., 1995; Burgeff et al., 2002). To further characterize this gene at the functional level, we isolated three *xal1* mutant alleles (Fig. 1B). The *xal1-1* allele has an *En-1* transposon insertion (Baumann et al., 1998) in the first exon of *XAL1* and the *xal1-2* allele is a T-DNA insertion in the second intron (see "Materials and Methods"), both in the Col-0 background. The third allele, *xal1-3*, is in the *Ler* background and is a stable transposon mutant allele with the insertion at the end of the fourth exon (Fig. 1B).

In all three mutant alleles, the primary root was shorter than in wild-type plants. *xal1-1* seedlings showed a root length intermediate between wild type and *xal1-2* and *xal1-3* (Fig. 1B), probably due to somatic reversion of this unstable transposon allele that occurred after several generations. We performed northern-blot and reverse transcription (RT)-PCR to corroborate *XAL1* mRNA levels in roots of the three mutant alleles. RT-PCR detected low expression of *XAL1* in the *xal1-1* allele, which correlates with its intermediate phenotype, whereas the other two alleles had no expression of *XAL1* mRNA (Fig. 1C).

To test whether the shorter roots of the three alleles could be due to altered cellular organization at the root tip, we analyzed 20 roots of each mutant allele under a confocal microscope. About 30% of the plants of all three alleles showed abnormal root apical meristem (RAM) organization, with the quiescent center (QC)



**Figure 1.** *XAL1* phylogeny and seedling mutant phenotypes. A, Bayesian reconstruction of the phylogenetic relationships among selected type II Arabidopsis MADS-box genes, with *XAL1* position indicated by an arrow. Numbers under the branches represent Bayesian posterior probability and can be interpreted as a measure of clade statistical support. B, Seedlings phenotype. Ten-day-old wild-type (Col-0 and Ler ecotypes) and *xal1-1*, *xal1-2*, and *xal1-3* alleles were grown on vertical 0.2× Murashige and Skoog plates. On the top, *XAL1* gene schematic model with the sites of transposon or T-DNA insertions are shown. C, *XAL1* expression in root tissue from 14-d-old seedlings. Total RNA of both wild-type ecotypes and *xal1* alleles were subject to northern-blot hybridization (10 μg/lane; top) and semiquantitative RT-PCR. 28S and *TUBULIN* were used as internal load controls, respectively.

and columella being most affected (see examples in Fig. 2A). In a median optical section, the columella initial cells and QC cells could not be clearly recognized and the general meristem organization resembled an open-type RAM (Baum et al., 2002; Chapman et al., 2003). As a result of this disorganization, the root-cap protoderm initials giving rise to both protoderm (epidermis) and lateral root cap were abnormal in shape or could not be detected. Typical T divisions in the epidermis could be detected only in the distal portion of the RAM. This abnormal organization led to an altered columella cell differentiation. Whereas in wild-type plants these cells usually increase in length in each subsequent tier along the root axis toward the distal root end (Fig. 2A), in the affected *xal1* plants the columella cells in the root cap were of similar size along the root axis, being almost isodiametric rather than elongated as in wild-type plants (Fig. 2A; data not shown).

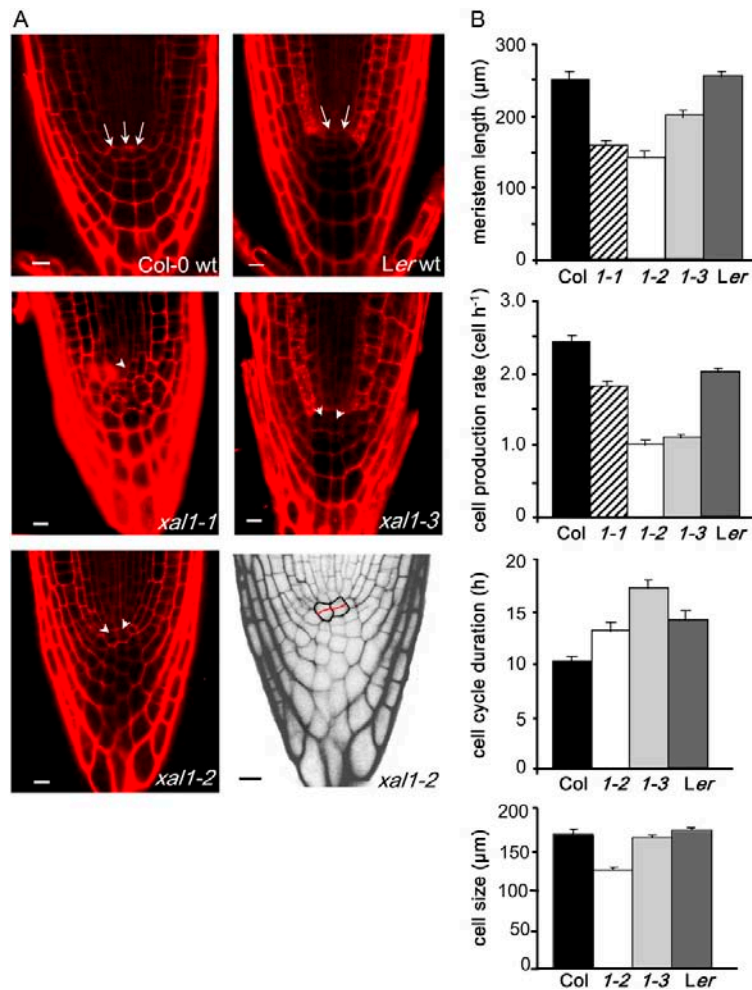
To further understand the observed shorter root phenotypes, we undertook quantitative cellular analyses of all *xal1* alleles. We have set up a protocol to document a series of cellular parameters geared to establish the role of root MADS-box or other types of genes in cellular homeostasis using the root as a study system (see “Materials and Methods”; Supplemental Table S1). These analyses revealed that all three alleles have a shortened meristem with a significantly lower rate of cell production, and *xal1-2* and *xal1-3* have longer cell-cycle duration than in wild-type plants (Fig. 2B). In all cell parameters quantified, *xal1-1* showed milder phenotypes than *xal1-2* and *xal1-3* alleles (Fig. 2B; Supplemental Table S1). Therefore, *XAL1* constitutes the first MADS-box gene that affects cell-cycle duration and for which quantitative cellular data have been put forward to evaluate the role of these genes in regulating cell proliferation within the RAM.

Given that *xal1* mutants have significantly affected rates of cell production and cell-cycle duration, as well as an altered apico-basal pattern of cell behavior, *XAL1* could be regulated by auxin or *XAL1* could mediate responses to auxin in the root. Gradients and movement in the root of this plant hormone are sufficient to guide root growth by affecting cell behavior in a dose-dependent fashion (Sabatini et al., 1999; Galinha et al., 2007; Grieneisen et al., 2007). Maximal auxin levels maintain cell quiescence, intermediate levels promote cell proliferation, and lower levels induce cell elongation and differentiation (Galinha et al., 2007; Grieneisen et al., 2007).

***XAL1* Is Expressed in the Phloem Tissue and *XAL1::GUS* Is Positively Induced by Auxins**

To test whether *XAL1* responds to auxin levels, we constructed transgenic lines with a 2.8-kb *XAL1* promoter region driving the expression of GFP (*XAL1::GFP*; Fig. 3A) and GUS (*XAL1::GUS*; Fig. 3B). In the root of 8-d-old plants, GUS expression was detected in the vascular cylinder after 24-h staining, starting from





**Figure 2.** Root phenotype of *xal1* mutants. A, Open meristem organization in *xal1* alleles. Seven-day-old seedlings were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. QC cells of wild type (arrows) and mutants (arrowhead) of representative phenotypes are shown (bar = 10  $\mu\text{m}$ ). Black-and-white zoom picture of *xal1-2* is shown to highlight abnormal periclinal divisions at the QC and deformed columella cells. B, Root cellular parameter analyses. Meristem length of 20 independent plants was measured from Col-0 and Ler wild-type plants and *xal1-1*, *xal1-2*, and *xal1-3* alleles (1-1, 1-2, 1-3). Cell production rate, cell-cycle duration, and fully elongated cell length were obtained as described in "Materials and Methods." Bars = ses, calculated with JMP, version 5.1.1, statistical package (see data in Supplemental Table S1).

the elongation zone at the level where no signs of protoxylem differentiation were as yet detectable (Fig. 3B; data not shown). *XAL1* promoter activity in the differentiation zone was associated predominantly with protophloem cells (Fig. 3B). These results were confirmed with independent *XAL1::GFP* transgenic lines, which also reported the expression of the *XAL1* promoter in the root phloem in an identical pattern observed in *XAL1::GUS* lines (Fig. 3A). Additionally, 6.8-kb promoter constructs, as well as mRNA in situ hybridization (data not shown), revealed expression in the phloem. However, in situ data (Burgeff et al., 2002) also showed expression of *XAL1* in the root meristem that could not be recovered in the lines of these constructs, probably due to the absence of the second regulatory intron.

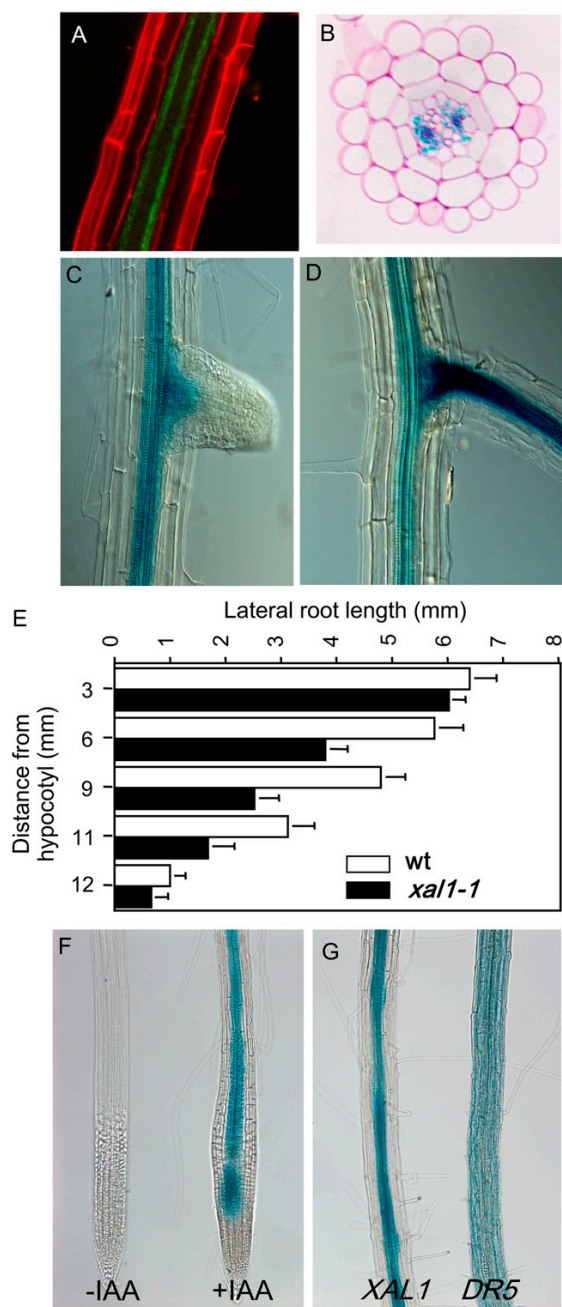
During lateral root formation, *XAL1::GUS* expression became lateral visible only after root emergence, and the pattern was similar to that observed in the primary root

(Fig. 3, C and D). This pattern of GUS activity driven by the *XAL1* promoter correlated well with a significant reduction also in lateral root length of the *xal1-1* plants compared to the wild-type plants (Fig. 3E).

Indole-3-acetic acid (IAA) treatment clearly induced GUS activity driven by the *XAL1* promoter (Fig. 3F). Interestingly, GUS expression was intensified only in the phloem tissue (Fig. 3G, left). In contrast, the *DR5(7X)::GUS* line in the wild-type background (Ulmasov et al., 1997) showed an expanded GUS activity domain that was found in all cell types when the roots were treated with auxins (Fig. 3G, right).

#### ***XAL1* Is a Positive Regulator of Flowering Transition That Responds to Photoperiod and Up-Regulates *SOC1*, *FT*, and *LFY***

While analyzing the *xal1* mutants, we realized that the plants were late flowering (Fig. 4A) and we de-



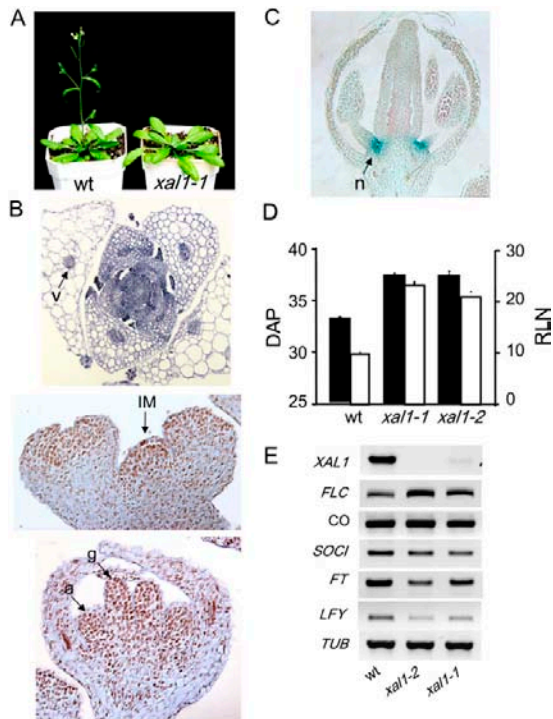
**Figure 3.** *XAL1* phloem expression is induced by auxins. A, Confocal image of an *XAL1::GFP* line taken at the protophloem plane, counterstained with propidium iodide. B, Transverse section of root *XAL1::GUS* line after GUS staining, counterstained with ruthenium red. C and D, *XAL1::GUS* expression in two different stages of lateral root development. E, Lateral root length along the primary root axis of the wild type (wt) and *xal1-1* allele ( $n = 15$  plants; bars =  $SE$ ). F, *XAL1::GUS* expression without (-IAA) and with (+IAA  $2 \mu M$ ). G, IAA-induced phloem GUS activity driven by the *XAL1* promoter (left) compared to the broad expression of the *DR5::GUS* line (right), after they were both treated with IAA ( $2 \mu M$ ).

decided to pursue this phenotype and explore whether *XAL1* was expressed in aerial tissues. Indeed, in situ hybridization of *XAL1* mRNA revealed expression in floral meristems and also in vascular tissues in leaves (Fig. 4B). Detailed analyses of GUS activity in flower sections demonstrated that *XAL1::GUS* was specifically expressed in young flower meristems, subsequently becoming restricted to the nectaries (Fig. 4C), which contain phloem cells (Baum et al., 2001).

We further characterized the late-flowering phenotype of the *xal1-1* and *xal1-2* mutants both in the Col-0 background. The most striking characteristic of these mutants was the significant delay in flowering time measured by the bolting time and the total number of rosette leaves observed under long-day (LD) photoperiods (16 h/8 h) in comparison to wild-type plants (Fig. 4D).

Flowering time is regulated in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) by a network of signaling elements that can be assigned to at least four different pathways (Boss et al., 2004): one that promotes flowering in response to LD photoperiods, one that is essential for flowering under noninductive short-day condition (SD) and depends on the plant hormone GA, one that operates both under LD and SD conditions (also called autonomous pathway), and one that regulates flowering time in response to vernalization (Blazquez et al., 1998; Koornneef et al., 1998b; Blazquez and Weigel, 2000; Putterill, et al., 2004). In our experiments, both *xal1* mutants flowered almost concurrently as wild-type plants under SD conditions (Table I). Moreover, vernalization or GA<sub>3</sub> application rescued the flowering-time defects of *xal1* plants to the same extent as in wild-type plants under LD photoperiods (Table I). Thus, *XAL1* does not seem necessary for the integrity of the autonomous, GA, or vernalization pathways, but seems to be specifically necessary for the correct functioning of the photoperiod flowering pathway (Koornneef et al., 1998a; Imaizumi and Kay, 2006).

To confirm a possible genetic interaction between *XAL1* and previously characterized genetic components of the photoperiod and other integrators of flowering transition pathways (Reeves and Coupland, 2000; Moon et al., 2003), we analyzed mRNA expression of a number of genes known to be key regulators of flowering transition (Fig. 4E). First, we confirmed that *XAL1* mRNA levels were reduced in the shoot of both mutants. Indeed, *xal1-1* has drastically reduced levels of expression and in *xal1-2* we were unable to detect any mRNA expression (Fig. 4E). Interestingly, the flowering promoters *FT*, *SOC*, and *LFY* were clearly reduced at the mRNA level with respect to wild type in both *xal1-1* and *xal1-2* mutant backgrounds (Fig. 4E). In contrast, *CONSTANS* (*CO*) and *GIGANTEA* (*GI*; data not shown), which are upstream regulators in the photoperiod pathway (Mouradov et al., 2002), did not show significant alterations in mRNA expression in the *xal1* mutants in the Col-0 background. Furthermore, *XAL1* is down-regulated in the *co-1* background, although it is not totally repressed (Supplemental Fig. S1). On the



**Figure 4.** Flowering phenotype of *xal1-1* and *xal1-2* mutants and *XAL1* role in the photoperiod pathway. **A**, Late-flowering transition phenotype of the *xal1-1* mutant compared to wild-type plants. Both plants were 32 d old. **B**, *XAL1* mRNA in situ hybridizations. *XAL1* expression (arrows) in vascular tissue (v) of a 20 d after planting (DAP) vegetative shoot transverse section (top); in the inflorescence meristem (IM) longitudinal section (middle); and in the gynoceium (g) and anthers of a floral meristem (bottom). **C**, GUS expression in a floral bud longitudinal section of the *XAL1::GUS* line. Strong GUS staining corresponds to the nectaries (n). **D**, Late-flowering phenotype of *xal1* mutants. Bolting time scored by DAP at bolting (see data for LD; Table I) in black bars and total rosette leaf number (RLN) in white bars of *xal1-1* and *xal1-2* alleles compared to wild-type plants (wt). **E**, Comparative transcript accumulation of genes that participate in the photoperiod and integrative flowering pathways. Gene expression levels were analyzed in the shoots of 14-d-old seedlings of wild type and *xal1* mutants by RT-PCR. *TUBULIN* was included as a constitutive control. **A** to **E**, Plants were grown under LD photoperiods.

other hand, *FLC*, which is a flowering repressor and acts over *FT* and *SOC* (Michaels and Amasino, 1999; Searle et al., 2006), showed a slight up-regulation with respect to wild-type plants in both of the *xal1* mutants studied. The latter results also correlate with the late-flowering phenotypes of these *xal1* alleles.

## DISCUSSION

We have shown here that the Arabidopsis MADS-box gene, *XAL1*, is required for normal root development and proper flowering transition based on mutant

phenotypes of two alleles in the Col-0 background and one allele in the *Ler* background. These alleles were named here *xaantal1-1*, *xaantal1-2*, and *xaantal1-3* due to their slow-growing root and late-flowering phenotypes. These results were unexpected considering that *XAL1* is a sister gene to the *AG*-related genes that are specific for reproductive tissues, and that most previously characterized MADS-box genes cluster in phylogenetic clades of genes with similar functions and expression patterns during flower, ovule, or carpel development (Rounsley et al., 1995; Alvarez-Buylla et al., 2000a). Nonetheless, previous studies for *XAL1* had already suggested that this gene could function in root development due to its high and apparently specific expression in roots (Rounsley et al., 1995; Burgeff et al., 2002). In this study, we have confirmed that *XAL1* is indeed expressed in roots, but we show that it is also expressed in aerial tissues prior to the transition to flowering and within floral meristems. In accordance with this pattern of expression, *XAL1* is also important for flowering transition.

Functional involvement in more than one tissue or developmental stage might be more common among MADS-box genes than originally believed based on the characterization of the flower-specific MADS-box genes of the A, B, and C functions (Coen and Meyerowitz, 1991). Indeed, recent studies have shown that most genes of this family are expressed in several plant tissues, organs, and developmental stages (Kofuji et al., 2003; Parenicová et al., 2003; Schmid et al., 2005). Other studies suggest that MADS-box functional specificity may depend on combinatorial protein-protein interactions (Egea-Cortines et al., 1999; Honma and Goto, 2001; de Folter et al., 2005; Kaufmann et al., 2005; Gregis et al., 2006; Sridhar et al., 2006), rather than on specific spatiotemporal expression patterns for each gene determined at the transcriptional level, as had been suggested before (Savidge et al., 1995; Alvarez-Buylla et al., 2000a).

### *XAL1* Is an Important Regulator of Cell Proliferation in the Root Meristem

In the root axis, three main zones with contrasting cell proliferation patterns can be distinguished: the RAM, where active cell proliferation takes place from the stem cell niche established around the QC or organizer, and two zones where cells are not proliferating, namely, the elongation and the differentiation zones (Fig. 5; Dolan et al., 1993; Ioio et al., 2007). The data summarized in this article suggest that *XAL1* is an important component of the molecular mechanisms controlling cell proliferation in the root. Consequently, the loss-of-function alleles analyzed for this gene show clear spatial alterations of cell behavior along the longitudinal axis of the Arabidopsis root with respect to wild-type plants. Our data suggest that this phenotype is indeed due to the lack of *XAL1* because we observed complementation to wild-type root phenotypes using a 35S::*XAL1* construct plasmid transformed into *xal1-1* and *xal1-2* (data not shown).

**Table 1.** Bolting time of *xal1-1* and *xal1-2* mutant plants compared to wild type (*Col-0*) at different flowering-transition pathways

Days after sowing are expressed as mean  $\pm$  SE and results for LD photoperiod are statistically significant. Flowering-time measurements and conditions for LD and SD photoperiods and both of them after vernalization (+VER) and gibberellin (+GA<sub>3</sub>) treatments, respectively, are explained in "Materials and Methods."

Plant Line	Growth Conditions			
	LD	LD + VER	SD	SD + GA <sub>3</sub>
Col-0	33.1 $\pm$ 0.4 (n = 78)	25.2 $\pm$ 0.6 (n = 37)	70.0 $\pm$ 0.7 (n = 38)	44.0 $\pm$ 0.5 (n = 21)
<i>xal1-1</i>	37.5 $\pm$ 0.5 (n = 48) <i>P</i> < 0.0001	28.0 $\pm$ 1.9 (n = 41)	68.1 $\pm$ 1.9 (n = 18)	–
<i>xal1-2</i>	37.4 $\pm$ 0.4 (n = 70) <i>P</i> < 0.0001	26.9 $\pm$ 0.5 (n = 46)	71.7 $\pm$ 0.7 (n = 27)	44.5 $\pm$ 0.5 (n = 21)

Drastically diminished levels of *XAL1* expression were correlated with altered cellular organization of the RAM, but only in one-third of the analyzed plants for the three *xal1* alleles. In these cases, we observed periclinal divisions of the QC early in root development and also lateral expansion of columella cells. However, all *xal1-2* and *xal1-3* mutant roots were shorter and had a decreased cell production rate, shorter elongated cells, and a significantly longer cell cycle that correlated with smaller meristems. Therefore, the altered cellular patterns at and around the QC in the affected plants are likely to be a consequence rather than a cause of the diminished cell production rates in the root meristem. In any case, these data suggest that type II plant MADS-box genes could be directly involved in cell-cycle regulation. The punctate pattern of mRNA in situ expression revealed for *XAL1* in the root meristematic tissues is also suggestive of a correlation of this gene expression with cell-cycle stage (Burgeff et al., 2002). In addition, *XAL1* is also involved in the regulation of cell elongation. However, this effect is apparently masked in the weaker *xal1-1* allele (data not shown; Supplemental Table S1; Figs. 2 and 5).

Future studies should further pursue the role of *XAL1* in the molecular networks controlling cell proliferation, elongation, and differentiation. Some components of such networks during root development have been characterized. *SHORT-ROOT* (*SHR*) and *SCARECROW* (*SCR*) are required for QC identity and normal root growth in addition to their role in radial patterning (Scheres et al., 1995; Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Wysocka-Diller et al., 2000; Nakajima et al., 2001; Sabatini et al., 2003). However, because the *SHR/SCR* pathway specifies the entire layer surrounding provascular tissues in the root, it is necessary, but not sufficient, to define the exact position of the stem cell niche. Auxin is also an important signal of QC establishment and it regulates the *SCR* and *PLETHORA* (*PLT*) genes, which are also necessary for QC determination (Sablowski, 2004b).

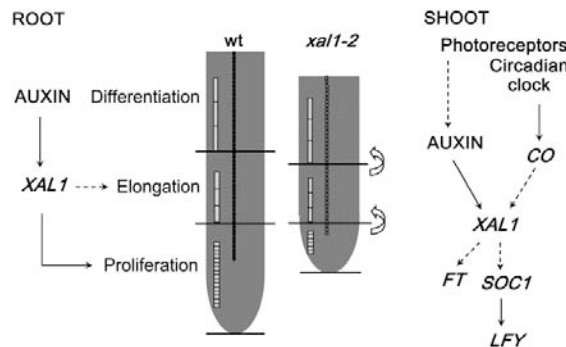
*WOX5* is also expressed in the QC and this gene seems to be necessary and sufficient for stem cell identity (Sarkar et al., 2007), probably with a more direct function in stem cell signaling, rather than in specifying QC identity. *WOX5* protein or, most probably a downstream factor, might move to stem cells to maintain their identity (Sarkar et al., 2007). In contrast to these

genes that have been shown to be important in QC specification and root growth, *XAL1* does not show a peak of expression in the QC or stem cell niche, but loss-of-function mutants in this gene also show cellular aberrations in this zone and clear alterations in cell proliferation and root growth. This suggests that this MADS-box gene could be itself a non-cell autonomous signal from more differentiated tissues (columella and vascular tissues) or control another non-cell autonomous downstream component, which could also be important for QC and stem cell behavior and thus cell production rate in the root meristem. It will be important to use genetic approaches to test whether *XAL1* functions are independent or not of *SCR*, *SHR*, and *WOX5* pathways.

Our data demonstrate that the cell production rate is lower in *xal1* mutants than in wild type, but premature cell differentiation could also contribute to the smaller meristems of *xal1* mutants. Interestingly, recent experiments have shown that cytokinins affect cell differentiation and define the root meristem by antagonizing from the transition zone a non-cell autonomous signal that could be auxin (Ioio et al., 2007). Moreover, down-regulation of cytokinins in the vascular tissue is sufficient to enlarge the root meristem by retarding the transition of cells to the elongation and differentiation zones. These results and *xal1* data presented here thus suggest that *XAL1* could be regulated and/or mediate cytokinin functions. This should be tested with genetic approaches.

#### Auxin Up-Regulates *XAL1* Specifically in the Root Phloem

Auxin promotes cell elongation, cell-cycle duration, and cell differentiation (Evans et al., 1994; Abel and Theologis, 1996; Himanen et al., 2002; Vanneste et al., 2005). In the root, auxin gradients and movement are sufficient to guide root growth (Sabatini et al., 1999; Galinha et al., 2007; Grieneisen et al., 2007) and affect cell behavior in a dose-dependent fashion (Galinha et al., 2007; Grieneisen et al., 2007). In concordance, auxin response or transport mutants display root-patterning defects and exogenous application of auxin induces ectopic QC and stem cells (Sabatini et al., 1999; Friml et al., 2002). Given that the *xal1* mutants analyzed here showed root phenotypes affected in these traits,



**Figure 5.** Model for the role of *XAL1* in root and shoot development. The MADS-box gene, *XAL1*, might mediate auxin participation in the proliferation of the root meristematic cells and the shoot meristem. In the root, *XAL1* may also be implicated in cell elongation because the *xal1-2* allele has smaller cells than wild type. Auxin may participate in the shoot meristem transition to flowering, mediating light induction of *XAL1*, which in turn may be an important promoter of downstream regulators in the photoperiod pathway. *CO* also induces *XAL1* expression probably by the classical photoperiod pathway. Solid arrows indicate direct proved regulation and dashed arrows suggest direct/indirect regulation.

*XAL1* could mediate auxin function. Indeed, our data clearly show that *XAL1* is up-regulated after IAA treatment within the root phloem tissues, where it is normally and strongly expressed. The *XAL1* promoter also responds positively to other auxin analogs, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2-4D) and naphthaleneacetic acid (NAA; data not shown). Our results thus suggest that there is a phloem-specific factor that responds to auxins and that is required for *XAL1* transcriptional up-regulation within these tissues or that *XAL1* is itself an auxin-responsive factor. The latter is supported by the presence of several auxin response elements, TGA (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) and SAUR boxes (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>; Higo et al., 1999) in the promoter of *XAL1*.

*XAL1* could also be important for phloem cellular patterning. Careful examination of the phloem in the *xal1* mutants indicated, however, that *XAL1* does not have a key role in the morphogenesis of this tissue on its own because procambial establishment and vascular cell identity in the root are not affected in *xal1* mutants in comparison to wild-type plants.

Downstream molecular mechanisms that integrate the cellular effects of auxins and other plant hormones, such as cytokinins, in different spatiotemporal domains during root development are not fully understood. Our data suggest that *XAL1* could be one component of such mechanisms. Interestingly, it has recently been suggested that the *PLT1* and *PLT2* genes, which depend on auxin and auxin response factors for expression, could be the read-out of the root auxin gradient (Galinha et al., 2007). The *XAL1* role on cell behavior along the root axis

could be related to *PLT1* and *PLT2* function or it could be part of an independent mechanism. The latter seems to be the case given that *XAL1* expression does not overlap with that of the *PLT1* and *PLT2*, which have a gradient-type expression pattern similar to that of auxins with a peak of expression at the QC (Aida et al., 2004). However, other *PLETHORA* (*PLT3* and *BBM*) genes have strong mRNA expression in the columella stem cell layer and the provascular tissues and could partially overlap with *XAL1* expression (Galinha et al., 2007).

#### ***XAL1* Is a Promoter of the Floral Transition and Participates in the Photoperiod Pathway**

Interestingly, *XAL1* is not only important for root development, but is also expressed in aerial tissues and is an important component of the photoperiod pathway of flowering transition, functioning as a flowering promoter in Col-0 Arabidopsis (Reeves and Coupland, 2000; Mouradov et al., 2002). The diminished mRNA levels of the three flowering promoters, *SOC*, *FT*, and *LFY* in the *xal1-1* and *xal1-2* mutant backgrounds are consistent with this interpretation. *FT* and *SOC* act as floral integrators of several pathways, whereas *LFY* is a flower meristem identity gene that positively responds to *FT* and *SOC1* (Blazquez and Weigel, 2000; Ng and Yanofsky 2000; Moon et al., 2003; Corbesier and Coupland, 2006). None of the other three flowering-transition pathways was affected in these mutant alleles (Table I).

In contrast to several key components of the photoperiod pathway (e.g. *CO*, *GI*, *CRYPTOCHROME2* [*CRY2*], and *FT*; Koornneef et al., 1998a; Simpson and Dean, 2002; Komeda, 2004), the *xal1* late-flowering phenotype under LD photoperiods can be recovered to a wild-type phenotype following vernalization (Michaels and Amasino, 2000). In agreement with this, the MADS-box flowering repressor *FLC* (Michaels and Amasino, 1999; Rouse et al., 2002) is up-regulated in *xal1* backgrounds. Therefore, our data suggest that *XAL1* could be downstream of *CO* and *GI* and upstream of *SOC*, *FT*, and *LFY*. However, complementation of *co* and *gi* mutants with *XAL1* overexpression constructs, and conversely the overexpression of *SOC1* in the *xal1* mutant backgrounds, should be pursued in the future to confirm the proposed role of *XAL1* in the photoperiod pathway.

There are two possibilities to reconcile the root data for the *xal1* mutants with their phenotypes in flowering transition. One possibility is that, given the recently proposed role for auxin response factors in flowering (Ellis et al., 2005; Okushima et al., 2005), *XAL1* is a mediator of auxin signaling and participates in the regulation of cell behavior in root and shoot meristems, thus altering their transitions (Fig. 5). The second possibility is that *XAL1* has different roles in root and aerial meristems as part of different complexes with other MADS-box proteins, or being a downstream component of different signaling mechanisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Materials and Growth Conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) wild-type, *xal1-1*, and *xal1-2* plants, *co-1*, and the *DR5(7X)::GUS* auxin reporter line (Ulmasov et al., 1997) are in the Col-0 genetic background, whereas *xal1-3* is in the *Ler* ecotype. Seedlings were grown on vertical plates with 0.2× Murashige and Skoog salts and 1% Suc. Plants were grown in climate chambers at 22°C. The photoperiods (110  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) were established at 16 h of light followed by 8 h of dark for LD photoperiods and 8 h of light followed by 16 h of dark for SD photoperiods.

### Identification of Mutant Alleles

The *xal1-1* allele was identified by screening for *En-1* insertions among a collection of Arabidopsis plants carrying approximately 50,000 independent insertions of the autonomous maize (*Zea mays*) transposable element (Baumann et al., 1998). The collection was screened in pools using the *En-1* transposon primer En205 (5'-AGAAGCAGCAGCGGTGTAGAATAGGA-3') and the internal *XAL1* primers OEAB141 (5'-GGTCGTGGTCTTCTCTGCT-3') and OEAB143 (5'-CATTTTCATCTTACACCAAC-3'). The *xal1-2* homozygous line was isolated from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre T<sub>2</sub> generation stock N429367 (former GK\_306H03 from the GABI-Kat collection). Plants 100% resistant to sulfadiazine were further confirmed by PCR using the following primers: GK T-DNA (5'-CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC-3') and specific *XAL1* primers NASC12-LP (5'-ACCCAAAACGTCAAATCATCAG-3') and NASC12-RP (5'-CTTTCATCCGAAACACAATGC-3'). The *xal1-3* allele was identified by screening on a two-component system mutagenized collection based on the maize mobile/transposon *Spm* as described by Speelman et al. (1999).

### Microscopy

Plant material for light microscopy was prepared as previously described by Malamy and Benfey (1997). Roots were visualized under an Olympus BX60 microscope. Confocal images were acquired on an inverted Zeiss LSM 510 Meta microscope with a 63× water immersion objective after root was stained with 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  propidium iodide.

### Quantitative Analysis of Cellular Parameters of Root Growth

Length of the meristem was determined for the cortex cells as the distance between the root-body/root-cap junction to the level where cells started to elongate, according to Casamitjana-Martinez et al. (2003). The length of the elongation zone was taken as the distance between the proximal meristem border and the location of the most distal root-hair bulge. The average cycle time for cortical cell production in plants growing between 7 to 8 d was done, using the rate of cell production (Ivanov and Dubrovsky, 1997). The duration of the cell cycle ( $T$ ) was calculated for each individual root using the following equation:  $T = (\ln 2 N_m / l_e) V^{-1}$ , where  $N_m$  is the number of meristematic cells in one file of the cortex,  $l_e$  are the fully elongated cell length calculated as the average length of 10 fully elongated cortex cells in the same root, and  $V$  is the root growth rate calculated as  $\mu\text{m h}^{-1}$ .  $N_m$  in 7- and 8-d-old roots (a period during which the rate of the root growth was estimated) was similar in both the wild-type and mutant plants, which enabled us to consider root growth to be at steady state and apply the method described above. The rate of cell production was estimated as  $V(l_e)^{-1}$  (Baskin, 2000). Statistical Student's  $t$  test or the Tukey-Kramer test (depending on the sample size) was analyzed by the JMP program, version 5.1.1.

### Reporter Lines

For *XAL1::GUS* and *XAL1::GFP* constructs, a 2.8-kb or 6.8-kb promoter and the 5' untranslated region were obtained from a Lambda genomic DNA library and cloned into pGEM-T vector (Promega) as a *Sall-XbaI* fragment. This fragment was subcloned into the pBI101 binary vector and the mGFP5-ER to generate the *XAL1::GUS* and the *XAL1::GFP* lines, respectively. Arabidopsis Col-0 ecotype plants were transformed using the floral-dip method (Clough and Bent, 1998). The transgenic lines were selected based on their kanamycin resistance and the expression analysis was carried out on T<sub>3</sub> homozygous lines.

### Hormone Treatments and GUS Reaction

*XAL1::GUS* and *DR5(7X)::GUS* seedlings were grown for 7 d in hormone-free medium plates and then transferred to growth medium supplemented with 2  $\mu\text{M}$  of the following hormones: IAA, NAA, and 2,4-D for 24 h. After hormone treatment, *DR5(7X)::GUS* and *XAL1::GUS* seedlings were subjected to GUS staining during 40 min at room temperature and 5 h at 37°C, respectively. Stained plants were cleared and visualized under a microscope.

### In Situ Hybridization and Histochemical Analysis

Inflorescence and bud flowers from wild-type and *xal1-1* were subjected to in situ hybridization (Drews et al., 1991). Digoxigenin-labeled *XAL1* probes were synthesized using a 113-bp cDNA template amplified with 5'-ATA-AAGCTGTGGAACCTC-3' and 5'-TAAGTACACACCACACTTG-3' primers, cloned in pGEM-T Easy vector.

For flower histochemical analysis, samples were processed according to the protocol described in Blazquez et al. (1998). For histological root analysis, GUS-stained samples were dehydrated through ethanol/histoclear series until they were substituted with 100% histoclear (National Diagnostics). Finally, material was embedded in Paraplast+ (Oxford Labware). Transversal sections of 8- $\mu\text{m}$ -thick GUS-positive root samples were counterstained with 0.1% ruthenium red (Scheres et al., 1994).

### Expression Analysis by Northern Blot and RT-PCR

Wild-type and mutant seedlings were grown for 14 d on Murashige and Skoog plates under LD conditions. Total RNA was isolated from root or shoot tissue separately using TRIzol reagent (Invitrogen). Semiquantitative RT-PCR was performed from two different experiments, each time with duplicates. PCR amplification conditions and sequence primers are described in Supplemental Table S2. RNA-blot hybridization was performed with 10  $\mu\text{g}$  of total RNA per lane with a gene-specific 3' probe, amplified with the following primers: 5'-GGATGTTATGCTTCAAGAAATTC-3' and 5'-CCAAATAATC-CATAAATCAAAC-3'.

### Flowering-Time Measurements

The bolting time was measured as the days after seed sowing required for the stem to develop 1 cm long under either photoperiod condition. Total number of rosette leaves included fully expanded and not fully expanded leaves. For experiments involving vernalization, seeds were plated on Murashige and Skoog medium and kept under dark for 6 weeks at 4°C and then transferred to soil and grown under LD conditions until flowering. To examine GA<sub>3</sub> effects on flowering time, 100  $\mu\text{M}$  GA<sub>3</sub> solution was sprayed once a week starting 30 d after sowing and continued until bolting. Data expressed as mean  $\pm$  SE were analyzed by the JMP program, version 5.1.1.

### Phylogenetic Analysis

We performed a Bayesian reconstruction of the phylogenetic relationships among selected type II Arabidopsis MADS-box genes using the whole cDNAs. Bayesian methods with MrBayes according to Huelsenbeck and Ronquist (2001) were used with a Markov chain Monte Carlo exploration of the tree likelihood surface. Four independent Markov chains (three heated) were used according to the Metropolis coupled scheme. The codon substitution model used was that of Goldman and Yang (1994). Four independent runs of 2,500,000 generations each were performed, and every 100th tree was saved. After checking for Markov chain convergence, we discarded the first 15,000 trees and used the remaining trees to calculate Bayesian posterior probabilities of the clades. Results from every independent run were similar.

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession number NC\_003070.5.

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** *XAL1* expression in *co-1* background.

**Supplemental Table S1.** Quantitative analysis of root development in *xal1-2* and *xal1-3* strong alleles and their respective control wild-type plants.

**Supplemental Table S2.** List of the oligonucleotides used for RT-PCR experiments.

## ACKNOWLEDGMENTS

Special thanks go to Marty Yanofsky for his guidance, comments, and support. In his laboratory, Gary Ditta helped with the initial molecular characterization of the *xal1-1* insertion line and Steve Rounsley constructed *XAL1::GUS* plasmids and obtained transgenics. We also thank L. Martínez-Castilla, D. Romo, S. Napsucially-Mendivil, and A. Saralegui for their technical support. V. Willemsen, I. Blilou, and D. Welch from B. Scheres' laboratory guided root techniques. Jane Murfett is acknowledged for the donation of the *DR5(7X)::GUS* line and Yu Hao for the co-1 allele. Stewart Gillmor helped in editing the last version of the paper.

Received September 3, 2007; accepted January 11, 2008; published January 18, 2008.

## LITERATURE CITED

- Abel S, Theologis A (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol* **111**: 9–17
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell* **119**: 109–120
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF (2000a) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* **24**: 457–466
- Alvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold S, Burgeff C, Ditta GS, Ribas de Pouplana L, Martínez-Castilla L, Yanofsky MF (2000b) An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* **10**: 5328–5333
- Baskin TI (2000) On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Mol Biol* **43**: 545–554
- Baum SE, Eshed Y, Bowman JL (2001) The Arabidopsis nectary is an ABC-independent floral structure. *Development* **126**: 4657–4667
- Baum ST, Dubrovsky JG, Rost TL (2002) Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in Arabidopsis thaliana (Brassicaceae) roots. *Am J Bot* **89**: 908–920
- Baumann E, Lewald J, Saedler H, Schultz B, Wisman E (1998) Successful PCR-based reverse genetic screen using an *En-1* mutagenised Arabidopsis thaliana population generated via single-seed descent. *Theor Appl Genet* **97**: 729–734
- Benfey PN, Scheres B (2000) Root development. *Curr Biol* **10**: R813–R815
- Blazquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D (1998) Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* **10**: 791–800
- Blazquez MA, Weigel D (2000) Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* **404**: 889–892
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell (Suppl)* **16**: S18–S31
- Bowman JL, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz EM, Smyth DR (1993) Control of flower development of Arabidopsis thaliana by APETALA1 and interacting genes. *Development* **119**: 721–743
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM (1991) Genetic interactions among floral homeotic genes of Arabidopsis. *Development* **112**: 1–20
- Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-Lopez R, Yanofsky MF, Alvarez-Buylla ER (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of Arabidopsis thaliana roots. *Planta* **214**: 365–372
- Caro E, Castellano MM, Gutierrez C (2007) A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in Arabidopsis. *Nature* **447**: 213–217
- Casamitjana-Martínez E, Hofhuis HF, Xu J, Liu CM, Heidstra R, Scheres B (2003) Root-specific CLE19 over-expression and the sol1/2 suppressors implicate a CLC-like pathway in the control of Arabidopsis root meristem maintenance. *Curr Biol* **13**: 1435–1441
- Chapman K, Groot EP, Nichol SA, Rost TL (2003) Primary root growth and the pattern of root apical meristem organization are coupled. *J Plant Growth Regul* **21**: 287–295
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735–743
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31–37
- Corbesier L, Coupland G (2006) The quest for florigen of recent progress. *J Exp Biol* **57**: 3395–3403
- de Folter S, Immink RGH, Kleffer M, Parenicova L, Henz SR, Weigel D, Bussher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, et al (2005) Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS box transcription factor. *Plant Cell* **17**: 1424–1433
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN (1996) The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* **86**: 423–433
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**: 71–84
- Drews GN, Bowman JL, Meyerowitz EM (1991) Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell* **65**: 991–1002
- Egea-Cortines M, Saedler H, Sommer H (1999) Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in Antirrhinum majus. *EMBO J* **18**: 5370–5379
- Ellis CM, Nagpal P, Young JC, Hagen G, Guilfoyle TJ, Reed JW (2005) AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in Arabidopsis thaliana. *Development* **132**: 4563–4574
- Espinosa-Soto C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla ER (2004) A regulatory network model for cell-fate determination during Arabidopsis thaliana flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell* **16**: 2923–2939
- Evans ML, Ishikawa H, Estelle MA (1994) Responses of Arabidopsis roots to auxin studied with high temporal resolution—comparison of wild-type and auxin-response mutants. *Planta* **194**: 215–222
- Ferrandiz C, Liljegren SL, Yanofsky MF (2000) negative regulation of SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development. *Science* **289**: 436–438
- Friml J, Benková E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jürgens G, et al (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**: 661–673
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**: 1053–1057
- Goldman N, Yang Z (1994) A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol Biol Evol* **11**: 725–736
- Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater MM (2006) AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 1373–1382
- Grieneisen VA, Xu J, Marée AFM, Hogeweg P, Scheres B (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008–1013
- Gu Q, Ferrandiz C, Yanofsky MF, Martienssen R (1998) The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development* **125**: 1509–1517
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* **101**: 555–567
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297–300
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339–2351
- Honma T, Goto K (2001) Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525–529
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) Mr Bayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**: 754–755
- Imaizumi T, Kay SA (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci* **11**: 550–558

- Ioio RD, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S** (2007) Cytokinin determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**: 678–682
- Ivanov VB, Dubrovsky JG** (1997) Estimation of the cell-cycle duration in the root apical meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate root growth. *Int J Plant Sci* **158**: 757–763
- Kaufmann K, Melzer R, Theißen G** (2005) MICK-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* **347**: 183–198
- Kofuji R, Sumikawa N, Yamasaki M, Kondo K, Ueda K, Ito M, Hasebe M** (2003) Evolution and divergence of the MADS-box gene family based on genome-wide expression analyses. *Mol Biol Evol* **20**: 1963–1977
- Komeda Y** (2004) Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 521–535
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Blankestijn-de VH, Hanhart CJ, Peeters AJM** (1998a) Genetic interactions among late flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **148**: 549–563
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Soppe W** (1998b) Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 345–370
- Lawrence PA, Morata G** (1994) Homeobox genes: their function in *Drosophila* segmentation and pattern formation. *Cell* **78**: 181–189
- Lazaro JB, Bailey PJ, Lassar AB** (2002) Cyclin D-cdk4 activity modulates the subnuclear localization and interaction of MEF2 with SRC-family coactivators during skeletal muscle differentiation. *Genes Dev* **16**: 1792–1805
- Liljegen SJ, Ditta GS, Eshed Y, Savidge B, Bowman JL, Yanofsky MF** (2000) SHATERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **404**: 766–770
- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44
- Mandel MA, Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky MF** (1992) Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. *Nature* **360**: 273–277
- Martínez-Castilla LP, Alvarez-Buylla ER** (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13407–13412
- Messenguy F, Dubois E** (2003) Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* **316**: 1–21
- Michaels S, Amasino R** (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS-domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**: 949–956
- Michaels SD, Amasino RM** (2000) Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ* **23**: 1145–1153
- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, 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 E, Coupland G** (2002) Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell (Suppl)* **14**: S111–S130
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, Benfey PN** (2001) Inter-cellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**: 307–311
- Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Stewart AJ, Jenkins GI, Caboche M, Lepiniec L** (2002) TRANSPARENT TESTA16 locus encodes the ARABIDOPSIS B-SISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* **14**: 2463–2479
- Ng M, Yanofsky MF** (2000) Three ways to learn the ABCs. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 47–52
- Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A** (2005) AUXIN REPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J* **43**: 29–46
- Parenicová L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater M, Davies B, et al** (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**: 1–15
- Pelaz S, Ditta G, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF** (2000) B and C floral identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* **405**: 200–203
- Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegen SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF** (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**: 85–88
- Putterill J, Laurie R, Macknight R** (2004) It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* **26**: 363–373
- Reeves PH, Coupland G** (2000) Response of plant development to environment: control of flowering by day. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 37–42
- Riechmann JL, Meyerowitz EM** (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem* **378**: 1079–1101
- Rijkema AS, Gerats T, Vandenbussche M** (2007) Evolutionary complexity of MADS complexes. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 32–38
- Rounsley SR, Ditta G, Yanofsky MF** (1995) Diverse roles for MADS-box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **7**: 1259–1269
- Rouse DT, Sheldon CC, Bagnall DJ, Peacock J, Dennis ES** (2002) FLC, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. *Plant J* **29**: 183–191
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfelt J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechthold N, Weisbeek P, et al** (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **24**: 463–472
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B** (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev* **17**: 354–358
- Sablowski R** (2004a) Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends Cell Biol* **14**: 605–611
- Sablowski R** (2004b) Root development: the embryo within? *Curr Biol* **14**: R1054–1055
- Samach A, Onuchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G** (2000) Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613–1616
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811–814
- Savidge B, Rounsley SD, Yanofsky MF** (1995) Temporal relationship between the transcription of the two *Arabidopsis* MADS-box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* **7**: 721–733
- Scheres B, Di Lorenzo L, Willemsen V, Hauser MT, Janmaat K, Weisbeek P, Benfey PN** (1995) Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* **121**: 53–62
- Scheres B, Wolkenfelt H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P** (1994) Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475–2487
- Schmid M, Davison TS, Heinz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501–506
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino S, Amasino RA, Coupland G** (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **20**: 898–912
- Simpson GG, Dean C** (2002) Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? *Science* **296**: 285–289
- Speulman E, Metz PLJ, van Arkel G, Hekkert BTL, Stiekeman WJ, Pereyra A** (1999) A two-component enhancer-inhibitor transposon mutagenesis system for functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* **11**: 1853–1866
- Sridhar VV, Surendrarao A, Liu Z** (2006) APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development* **133**: 3159–3166
- Ulmasov T, Murfelt J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963–1971
- Vanneste S, De Rybel B, Beeemster GT, Ljung K, De Smet I, Van Isterdael G, Naudts M, Iida R, Gruijssem W, Tasaka M, et al** (2005) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **17**: 3035–3050
- von Dassow G, Odell GM** (2002) Design and constraints of the *Drosophila* segment polarity module: robust spatial patterning emerges from intertwined cell state switches. *J Exp Zool* **294**: 179–215
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, Heidstra R, Bilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Gruijssem W, Scheres B** (2005) THE RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell* **123**: 1337–1349
- Wysocza-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy JE, Benfey PN** (2000) Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* **127**: 595–603
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldman KN, Meyerowitz EM** (1990) The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene AGAMOUS resembles transcription factors. *Nature* **346**: 35–40



Table S1: Quantitative analysis of root development in *xal1-2* and *xal1-3* strong alleles, and their respective wild-type plants.

Plant line	Rate of root growth ( $\mu\text{m h}^{-1}$ )	Meristem length ( $\mu\text{m}$ )	Elongation zone ( $\mu\text{m}$ )	Length of fully elongated cells ( $\mu\text{m}$ )	Cell cycle duration (h)	Cell production rate ( $\text{cell h}^{-1}$ )
Col-0 <i>n</i> =17	394 $\pm$ 11	249 $\pm$ 10	1086 $\pm$ 58	164 $\pm$ 6	10.0 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.3
<i>xal1-2</i> <i>n</i> =20	134 $\pm$ 7	139 $\pm$ 5	548 $\pm$ 25	120 $\pm$ 3	12.6 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.1
Statistics, <i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.029	<0.001
Ler <i>n</i> =20	313 $\pm$ 7	254 $\pm$ 6	1231 $\pm$ 29	169 $\pm$ 3	14.2 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.04
<i>xal1-3</i> <i>n</i> =20	187 $\pm$ 6	198 $\pm$ 7	1312 $\pm$ 33	160 $\pm$ 3	16.9 $\pm$ 0.8	1.2 $\pm$ 0.04
Statistics, <i>P</i>	<0.001	<0.001	0.072	0.064	0.009	<0.001

Mean $\pm$ SE. As the number of replicates was unequal for Col-0 and *xal1-2*, the *P* was calculated using Mann-Whitney Rank Sum Test; statistical analysis of Ler and *xal1-3* was done using Student's independent *t* test; *n* indicates the number of plants analyzed of two independent experiments. Length of fully elongated cells was calculated as average of averages per each root; in each root 10 cortical cells were measured in young differentiated zone.

TABLE S2: Primers sequences and amplification conditions used for RT-PCR experiments.

<b>Gene</b>	<b>Product size and Cycles number</b>	<b>Primer sequence</b>
<b><i>XAL1</i></b>	360bp 30-35X	F 5' TGGTCGTGGTTCTTCTCTGCT3' R 5' TGTCTCCATGACTGCCAAGTT3'
<b><i>SOC1</i></b>	400bp 25X	F 5' TGAGGCATACTAAGGATCGAGTCAG3' R 5' GCGTCTCTACTTCAGAACTTGGGC3'
<b><i>CO</i></b>	600bp 25X	F 5' AACAGTGACAGATCCAGAGAACAG3' R 5' TTCTCTGCATACGCTTTCCTTGAA3'
<b><i>GI</i></b>	450bp 30X	F 5' CTTTGTCTCCATGGATCAGT3' R 5' AAGGAGTTCACAAAGCTGTA3'
<b><i>FLC</i></b>	596bp 30X	F 5' TTCTCCAAACGTCCGCAACGGTCTC 3' R 5' GATTTGTCCAGCAGGTGACATCTC 3'
<b><i>FT</i></b>	380bp 30X	F 5' CCTGCTACAACCTGGAACAACCTTT3' R 5' GCTATATAGGCATCATCACCGTTCGTTACTCG3'
<b><i>LFY</i></b>	450bp 30X	F 5' TCATTTGCTACTCTCCGCCGCT3' R 5' CATTTTTCGCCACGGTCTTTAG3'
<b><i>TUB</i></b>	600pb 25X	F 5' CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA3' R 5' TCACCTTCTTCATCCGCAGTT3'

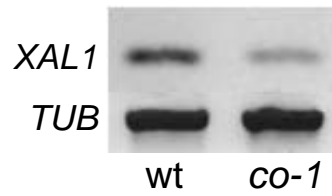


Fig S2. *XAL1* expression in *constans-1* background. Semi quantitative RT-PCR was performed using RNA from 14 days old shoots of wild-type (wt) and *constans-1* mutant (*co-1*). *Tubulin* (*TUB*) was amplified as an internal loading control.

## DISCUSIÓN

La regulación genética a nivel de la transcripción es crucial para casi todos los procesos biológicos en una célula o en los organismos complejos.

En las plantas, existen algunas familias de factores transcripcionales claves para el desarrollo, y entre ellos los que producen mutantes homeóticas son particularmente interesantes. La mayoría de los genes que al mutarse producen este tipo de alteraciones pertenecen a la familia de factores de transcripción MADS-box. En *Arabidopsis thaliana*, esta gran familia genética consiste de 107 miembros, los cuales pueden ser divididos a su vez en 5 subfamilias, llamadas MICK, M $\alpha$ , M $\beta$ , M $\delta$  (Alvarez-Buylla et al., 2000; Parenicova et al., 2003; León Martínez y Alvarez-Buylla 2003). Los genes MADS-box de plantas que han mostrado controlar la mayoría de los diferentes procesos o estadios del desarrollo pertenecen principalmente a la subfamilia MICK con funciones involucradas en la inducción floral, arquitectura de la planta, desarrollo del gametofito femenino, formación y maduración de frutos, señalización por nitrato y desarrollo de órganos florales (Alvarez-Buylla et al., 2000; Ng y Yanofsky, 2001; De Bodt S. et al., García Maroto et al., 2003, Parenicova, et al., 2003; Ferreraio et al., 2004; Immick et al., 2009). En el pasado muchos escrutinios de genética tradicional e inversa permitieron conocer un gran número de mutantes de estos genes. Sin embargo, sólo aproximadamente el 20% de los genes MADS-box tienen un fenotipo de pérdida de función evidente caracterizado, y pertenecen en su mayoría a los miembros del linaje tipo II (MICK) (Álvarez-Buylla et al., 2000). La redundancia funcional es un fenómeno que es a menudo observado cuando se estudian familias de genes muy grandes. La conservación de las cajas MADS de unión al ADN dentro de cada linaje y hasta cierto punto entre todos los genes MADS secuenciados hasta ahora, sugiere una restricción funcional importante y que algunas funciones fundamentales de estos genes se han conservado a lo largo de la evolución de los eucariontes y de manera muy importante en las plantas (Kauffman et al., 2005; Inmmink et al, 2010).

Las proteínas MADS-box tipo MICK de plantas son proteínas modulares, en las cuales cada dominio está involucrado en funciones moleculares específicas (Honmma & Goto , 2001; Kauffnan et al., 2005). Estas proteínas comparten su estructura modular con otras proteínas regulatorias y contienen varios motivos de interacción proteína-proteína, las cuales son claves para su actividad molecular. A pesar de que se conoce que la identidad de órganos florales está controlada a través de la activación temporal y espacial, así como por el silenciamiento de algunos factores de transcripción, poco se sabe acerca de sus complejos mecanismos de regulación. En el caso de los genes MADS-box *AG*, *FLC* y *PLE*, su expresión está regulada por regiones intragénicas (Bradley, et al., 1993; Sieburth y Meyerowitz, 1997; Deyholos y Sieburth, 2000; Sheldon *et al.*, 2002), así como por otros mecanismos postranscripcionales tales como la producción de RNA pequeños, regulación epigenética (Rhoades *et al.*, 2002; Bartel y Bartel, 2003; Kaufmann *et al.*, 2010) entre otros.

Estudios de interacción de proteínas MADS-box de mamíferos y levaduras revelaron que existe homodimerización y heterodimerización entre éstas (Schwartz-Sommer *et al.*, 1992; Riechmann *et al.*, 1996), y que a su vez estas proteínas interactúan con proteínas de diferentes familias tales como proteínas con motivos ricos en leucinas (Gamboa et al., 2001) y factores de transcripción de otras familias tipo proteínas bHLH (Zik y Irish., 2003). De manera reiterada diferentes grupos han reportado que los factores de transcripción generalmente no trabajan de forma aislada, sino a través de la unión de co-reguladores, formando grandes complejos reguladores de la transcripción que cooperan e interactúan entre sí (Thiessen y Saedler, 2001; Thiessen, 2001). Se ha propuesto que la dimerización y formación de complejos altamente ordenados de las proteínas MADS proveen un mecanismo ideal para incrementar la especificidad funcional, la cual se refleja en diferentes capacidades de unión de los distintos complejos (Theissen, 2001). Aunque, la evidencia muestra que éstos complejos tienen mayor afinidad que los dímeros por ciertos elementos del DNA con los motivos CArG-box (Immink *et al.*, 2010), el papel preciso de la

multimerización y de la selección de aliados en el reconocimiento secuencia-específico de los sitios blanco apenas comienza a descifrarse.

En este trabajo caracterizamos funcionalmente a *XAL1/AGL12*, un gen MADS-box involucrado en diferentes procesos del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Encontramos que *XAL1/AGL12* se requiere tanto para el desarrollo normal de la raíz, como para la transición floral, de acuerdo a los fenotipos que encontramos en dos alelos mutantes del ecotipo Col-0 y un alelo más en el ecotipo Ler. Nombramos a estos alelos *xaantal1-1*, *xaantal1-2*, y *xaantal1-3* por a su fenotipo con un crecimiento lento en la raíz y de floración tardía. Los resultados obtenidos no se esperaban considerando que por la expresión del mRNA de *XAL1/AGL12*, se había reportado como un gen específico de la raíz (Rounsley *et al.*, 1995; Burgeff *et al.*, 2002; Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a).

### ***XAL1/AGL12 participa en la regulación de la proliferación celular y el patrón de desarrollo del meristemo de la raíz***

En el eje de la raíz, se pueden distinguir tres zonas principales con patrones de proliferación celular contrastantes: el meristemo apical de la raíz (RAM), donde la activa proliferación celular tiene lugar a partir del nicho de las células madre establecidas alrededor del CQ, y dos zonas donde prácticamente no hay proliferación, llamadas, zona de elongación y zona de diferenciación (Figura 5 del artículo Tapia-López *et al.*, 2008; Dolan *et al.*, 1993; De loio *et al.*, 2007

Nuestros resultados sugieren que *XAL1/AGL12* juega un papel importante en los mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular en la raíz. La drástica disminución de los niveles del mRNA de *XAL1* se correlacionó con la organización celular alterada en el RAM (Figura 2 del artículo Tapia-López *et al.*, 2008). Aunque solo una tercera parte de las raíces analizadas para los tres alelos mutantes de *xal1* mostró esta desorganización. En estos casos, observamos divisiones periclinales en el CQ tempranas en el desarrollo de la raíz y también expansión lateral de las células

de la columela. Es importante mencionar que todas las raíces de los alelos mutantes *xal1-2* y *xal1-3* fueron más cortas y presentaron una producción celular disminuida en comparación con las plantas silvestres y células totalmente elongadas más cortas, así como un ciclo celular significativamente más largo que correlaciona con los meristemas pequeños. Por lo tanto, los patrones celulares alterados alrededor del CQ en las plantas afectadas parecen ser una consecuencia más que una causa de la disminución de la tasa de producción celular en el meristemo de la raíz. En cualquier caso, estos datos sugieren que *XAL1* y posiblemente otros genes MADS-box tipo II de plantas pudieran estar directamente involucrados en la regulación del ciclo celular, tal como se ha reportado para otros genes de la misma familia involucrados en el crecimiento de órganos florales (Dornelas et al., 2011). El patrón punteado del mRNA en los análisis de expresión *in situ* de *XAL1* en el tejido meristemático de raíz también apoyan que la expresión de este gen está involucrado en el ciclo celular (Burgeff et al., 2002).

El mutante en *XAL1* también presenta células diferenciadas más cortas que las silvestres, por lo que es posible que este gen esté relacionado con las transiciones por las que atraviesan las células meristemáticas hasta alcanzar su tamaño final. Sin embargo, este efecto aparentemente se enmascara en el alelo débil *xal1-1* (datos no mostrados; Figuras 2 y 5 y Tabla S1 de material suplementario del artículo Tapia-López et al., 2008). Estudios futuros deberían seguir más a fondo el papel de *XAL1* y su relación con otros genes de las redes moleculares que controlan la proliferación, elongación y diferenciación celular.

El tamaño y mantenimiento del meristemo apical de la raíz, se debe en gran medida a una fina y probablemente redundante regulación a varios niveles. El balance entre la división y la diferenciación celular involucra el control hormonal, la señalización cruzada de las fitohormonas, factores de transcripción, péptidos capaces de moverse de un tipo celular a otro (RGR's) (Sozzani y Pascuzzi. 2012; Perilli et al., 2012) y recientemente se han integrado a este grupo de reguladores un factor transcripcional más, el gen *UPBEAT1* el cual pertenece a la familia de las proteínas bHLH,

involucrado en la regulación y acumulación diferencial de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la raíz (Tsukagoshi *et al.*, 2010).

Dentro de los factores de transcripción involucrados en dichas redes reguladoras del desarrollo de la raíz están dos factores transcripcionales *SHORT-ROOT (SHR)* y *SCARECROW (SCR)*, los cuales se requieren para la identidad de CQ y el crecimiento normal de la raíz además de su papel en el patrón radial (Scheres *et al.*, 1995; Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000; Wysocka-Diller *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2001, Sabatini *et al.*, 2003). No obstante, debido a que las vías *SHR/SCR* especifican a los tejidos que rodean los tejidos vasculares en la raíz, son necesarias, aunque no suficientes, para definir la posición exacta del nicho de las células troncales (Sabatini *et al.*, 2003; Sablowski, 2004a). Se ha descrito que las auxinas son una señal importante para el establecimiento y mantenimiento del meristemo de la raíz y a su vez regulan a los genes *SCR* y *PLETHORA (PLT)*, los cuales son necesarios para la determinación del CQ (Sablowski, 2004b). *WOX5* gen codifica para una proteína HOMEO-box que se expresa en el CQ y este gen es necesario y suficiente para la identidad de las células troncales (Sarkar *et al.*, 2007), probablemente con una función más directa en la señalización de las células troncales, más que en la especificación de la identidad del CQ. La proteína *WOX5* o, mas probablemente un factor corriente abajo podría también participar en el mantenimiento de la identidad de las células troncales (Sarkar *et al.*, 2007). En contraste con estos genes que han mostrado ser importantes en la especificación del CQ y del desarrollo de la raíz, *XAL1* no parece mostrar un pico de expresión en el CQ o en el nicho de las células troncales, pero las mutantes de pérdida de función en este gen también muestran aberraciones celulares en esta zona y claras alteraciones en la proliferación celular y crecimiento de la raíz como se muestra en el material suplementario y las publicaciones que sustentan esta tesis), además de que su expresión es regulada positivamente por las auxinas. Esto sugiere que *XAL1/AGL12* pudiera por sí mismo actuar como una señal autónoma a partir de tejidos más diferenciados (columela y tejidos vasculares) o controlar otros componentes corriente abajo de manera no autónoma, los cuales pudieran también ser importantes para el



mantenimiento del CQ y el comportamiento de las células troncales, y por consiguiente para la tasa de producción celular en el RAM. Será importante usar enfoques genéticos para probar una posible participación de *XAL1* en la intrincada red de regulación del tamaño y mantenimiento del meristemo. Comenzando con la evaluación de si las funciones de *XAL1* son o no independientes de las vías de *SCR*, *SHR*, *SHY2* y *WOX5*, o alguno de los componentes de la biosíntesis de señalización de otras hormonas e inclusive de las involucradas con las ROS.

Nuestros datos demuestran que la tasa de producción celular es menor en las mutantes *xa11* que en las silvestres, aunque la diferenciación celular prematura también pudiera contribuir a los meristemos pequeños en los alelos mutantes de *xa11* (Ver artículos que sustentan esta tesis). Es interesante que algunos experimentos han mostrado que las citoquininas afectan la diferenciación celular y definen el meristemo de la raíz antagonizando a partir de la zona de transición a una señal que actúa de manera no autónoma a nivel celular, que son las auxinas (Dello Iorio *et al.*, 2007). Además, la disminución de las citocininas de forma experimental en el tejido vascular es suficiente para extender el meristemo de la raíz por el retraso de la transición de las células a las zonas de elongación y diferenciación. Estos resultados y los datos de *xa11* presentados a lo largo de este trabajo sugieren que *XAL1* pudiera ser regulado y/o mediar funciones de las citoquininas. Esto se puede probar a partir de enfoques genéticos en dobles mutantes afectadas en la señalización de esta hormona y *xa11* o bien sobre expresando este gen en aquellas mutantes en donde la zona de diferenciación es más grande a la zona de proliferación, como aquellos mutantes que el transporte o la señalización de auxinas están afectados y por ende el rango de acción de las citocininas se encuentra aumentado.

### ***Relación de las auxinas y XAL1 en el floema de la raíz.***

Las auxinas promueven la proliferación y elongación celular (Evans *et al.*, 1994; Abel y Theologis, 1996; Himanen *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2005). El gradiente de auxinas establecido por el transporte de las mismas es indispensable para el

crecimiento de la raíz (Sabatini *et al.*, 1999; Galinha *et al.*, 2007; Grieneisen *et al.*, 2007) y afectan al tipo celular de una manera dosis dependiente (Galinha *et al.*, 2007; Grieneisen *et al.*, 2007). En concordancia, mutantes afectados en el transporte de esta hormona han mostrado defectos en los patrones de la raíz y la aplicación exógena de auxinas induce la formación de CQ y formación de células troncales de forma ectópica (Sabatini *et al.*, 1999; Friml *et al.*, 2002). Dado que las mutantes *xal1* analizadas aquí muestran raíces con fenotipos afectados en estas características, *XAL1* pudiera estar involucrado en mediar la función de las auxinas. De hecho, la construcción *XAL1:GUS* se activa por IAA y otros análogos como: el ácido diclorofenoxyacético (2-4D) y al ácido naftalenacético (NAA; datos no mostrados), específicamente en el tejido vascular. Estos resultados sugieren que existe un factor específico de floema que responde a las auxinas y que es requerido por *XAL1* para su activación transcripcional dentro de estos tejidos, por lo que se debe explorar la posibilidad de que *XAL1* sea un factor de respuesta a auxinas. Esta última hipótesis se basa en la presencia de varios elementos de respuesta a auxinas en el promotor de *XAL1*, tales como las cajas TGA y las cajas SAUR (Higo *et al.*, 1999) (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE;> <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>, <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) y (Ver artículos que sustentan esta tesis y el material complementario).

También es posible considerar que *XAL1* al expresarse en el floema, pudiera estar participando en la formación del tejido vascular. Sin embargo, la revisión cuidadosa del floema en las mutantes *xal1* mostró que este gen no juega un papel clave en la morfogénesis de este tejido, ya que en estas mutantes el establecimiento del procambium y la identidad vascular celular en la raíz no se vieron afectadas, o bien, que *XAL1* es redundante con otros factores involucrados. Los mecanismos moleculares que integran los efectos celulares de las auxinas y otras fitohormonas, como las CKs, que se expresan en diferentes dominios espacio-temporales durante el desarrollo de la raíz no han sido totalmente entendidos aún y *XAL1* podría funcionar como uno de los reguladores del desarrollo del procambium. Es importante

señalar que recientemente se ha sugerido que los genes *PLT1* y *PLT2*, están relacionados con las auxinas y con factores de respuesta a auxinas, y pudieran ser éstos los que transducen el nivel de acumulación de las auxinas a nivel celular (Galinha *et al.*, 2007). La exploración de la función de *XAL1* y los genes *PLT1* y *PLT2* en el comportamiento celular a lo largo del eje de la raíz podría dar luz para entenderlos mecanismos de regulación de las hormonas. Es importante señalar que la expresión de *XAL1* no se sobrelapa con la de los genes *PLT1* y *PLT2*, que tienen un patrón de expresión tipo gradiente, similar al de las auxinas, con un pico de expresión en el CQ (Aida *et al.*, 2004). Sin embargo, otros genes de la familia *PLETHORA* (*PLT3* y *BBM*) si presentan una fuerte expresión en la capa de la columela de las células madre y en tejidos provasculares y que por tanto podrían tener relación con la actividad de *XAL1* (Galinha *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó, la señalización dada por las auxinas en el nicho de las células troncales se encarga de controlar su actividad y mantener el CQ, sin embargo, las CKs delimitan el dominio la zona de proliferación celular (Dello Iorio *et al.*, 2008). Las proteínas AUX/IAA como SHORT HYPOCOTYL 2 (*SHY2*), son reguladores negativos de la señalización de auxinas, y juegan un papel importante en este proceso (Moubayidin *et al.*, 2010; Sozzani y Iyer-Pascuzzi, 2014). El máximo de la expresión de *SHY2* se activa por dos genes reguladores de la respuesta a las CKs, *ARR1* y *ARR12*. Una vez iniciada la germinación, los niveles de CKs se mantienen bajos y *ARR12* promueve la expresión basal de *SHY2*, mientras que *ARR1* se encuentra reprimido en parte por altos niveles de las giberelinas (otras hormonas de crecimiento). Los niveles bajos de *SHY2* permiten la expresión de los transportadores de auxina PIN, aumentando así los niveles de auxina en el zona de proliferación y una tasa de división celular elevada (Dello Iorio *et al.*, 2007; Moubayidin *et al.*, 2010). Casi al final de la fase de crecimiento disminuyen los niveles de auxinas y GA's y se incrementan los de CK's debido a la activación de *ARR1* (factor transcripcional de respuesta a estas últimas), teniendo como consecuencia la activación de *SHY2*, el cual reprime la señalización de auxinas aumentando la diferenciación celular (Sozzani y Iyer-Pascuzzi, 2014). Retomando el papel de *XAL1*,

con respecto a su fenotipo con una raíz más corta en el que presenta un meristemo más corto, debido a un retraso en el ciclo celular, y tomando en cuenta que las auxinas y las GA's regulan el tamaño del meristemo incrementando la división celular, se realizaron experimentos en los que se revisó en plántulas de *xa1* la expresión de diferentes genes involucrados en la biosíntesis de GAs. Sin embargo, de los genes analizados no se encontraron cambios en los niveles de expresión de estos con respecto a los obtenidos a partir plántulas silvestres (datos no mostrados). Sería interesante por consiguiente analizar la expresión de *XAL1* en las mutantes de *SHY2*, *ARR1* y *ARR12* y viceversa analizar la expresión de estos genes en el mutante *xa1*.

Los fenotipos observados en la raíz de mutantes de *XAL1* como la disminución de la proliferación celular y posible afectación en las etapas de transición hacia la diferenciación, que dan como resultado células más cortas que las del tipo silvestre, así como la activación de la expresión de *XAL1:GUS* en respuesta a las auxinas, sugieren que puede haber una interrelación entre la señalización de auxinas, GAs y citiquininas y la red transcripcional en la que participa *XAL1*.

### ***Papel de XAL1/AGL12 en la transición a la floración***

El gen *XAL1* pertenece al clado de *AGAMOUS* (Figura 1 del artículo Tapia-López *et al.*, 2008), es un gen hermano de genes involucrados en funciones diferentes pero todas relacionadas con el desarrollo floral y reproductivo (Martínez-Castilla *et al.*, 2003; Kramer *et al.* 2004). *AG*, uno de los genes más estudiados de este grupo, es un regulador maestro involucrado en la determinación de los meristemos florales, y determinante en el desarrollo de estambres y carpelos, al interactuar con otros genes MADS-box como *AP3/PI* y *SEP3*, respectivamente (Yanofsky *et al.*, 1990; Rounsley *et al.*, 1995; Gómez-Mena *et al.*, 2005). Otros miembros del clado al que pertenece *XAL1* como los genes *SPH1/2* están implicados en la dehiscencia de fruto (Liljegren *et al.*, 2000), mientras que *STK* participa en el desarrollo de la zona de dehiscencia en el funículo y se expresa en el óvulo (Pynopich, *et a.l.*, 2003). En este estudio

confirmamos que *XAL1* se expresa en las raíces y que además se expresa en tejidos aéreos previo a la transición a la floración y ya dentro de los meristemas florales se expresa en nectarios de la flores en desarrollo, y además está involucrado en la transición a la floración por presentar un fenotipo de floración tardía.

Como ya se mencionó, *XAL1* se expresa en tejidos aéreos y es un componente importante de la vía del fotoperíodo en la transición floral, ya que los alelos mutantes son de floración tardía sólo bajo la condición de día largo (Reeves y Coupland, 2000; Mouradov *et al.*, 2002). Consistentemente con esta interpretación, al analizar la expresión de diferentes genes promotores de la floración, se encontró una disminución en los niveles del mRNA de tres de los promotores florales *SOC1*, *FT*, *LFY* en los alelos mutantes *xal1-1* y *xal1-2*. *FT* y *SOC* actúan como integradores florales de varias vías, mientras que *LFY* es un gen de identidad de meristemo floral que responde positivamente a *FT* y *SOC1* (Blazquez y Weigel, 2000; Ng y Yanofsky 2000; Moon *et al.*, 2003; Corbesier y Coupland, 2006). De acuerdo con nuestros resultados, el represor floral MADS-box *FLC* (Michaels y Amasino, 1999; Rouse *et al.*, 2002) se encuentra inducido en las mutantes *xal1*, lo que explica el fenotipo de floración tardía. Con base en estos resultados sugerimos que *XAL1* pudiera ser parte de la red de regulación floral que induce la floración bajo fotoperíodo de día largo y que es regulado parcialmente por *CO* y *GI*. *XAL1* a su vez, regula la expresión de *FT*, *SOC*, y *LFY*. En un futuro, para comprobar genéticamente estas interacciones se requiere de hacer dobles mutantes entre *xal1-co* y *xal1-ft* y para determinar si *XAL1* regula de forma directa a *FT*, así como posteriormente revisar la opción de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. Además de que el gen *FT* presenta varias cajas CArG tanto en su promotor como en el primer intrón, lo cual hace factible que pueda ser regulado por diferentes combinaciones de genes MADS-box (Helliwell *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los datos que obtuvimos en el trabajo aquí reportado y publicado en el artículo de *Plant Physiology*, muestran que *XAL1/AGL12* es un componente importante de los mecanismos moleculares que controlan tanto la proliferación celular en el meristemo de la raíz como la elongación celular. Además, los alelos de pérdida de función de *XAL1* también mostraron alteraciones en el nicho de células troncales y en las células de la columela. Estas alteraciones correlacionaron con una menor tasa de proliferación celular en las mutantes de este gen con respecto a plantas silvestres. El análisis de los diferentes alelos sugirió que los patrones celulares alterados que se localizan cerca del CQ pudieran deberse a una consecuencia, más que una causa, que provocara una disminución en la de la tasa de producción celular en las mutantes *xa1*.

Proponemos que existen dos posibilidades que permiten reconciliar los fenotipos de la raíz para las mutantes *xa1* con el fenotipo de floración tardía. Una posibilidad es que *XAL1/AGL12* funcione como un mediador de la señalización de las auxinas y participe en la regulación del comportamiento celular y/o las transiciones de ambos meristemos apicales: el RAM y el SAM (Figura 5 del artículo Tapia-López, 2008) (Ellis *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2005). La segunda posibilidad es que *XAL1/AGL12* tenga diferentes papeles en cada uno de los meristemos apicales al formar parte de diferentes complejos con otras proteínas, o siendo un componente corriente abajo de diferentes mecanismos de señalización.

La participación funcional de los genes MADS-box en más de un tejido, o estado de desarrollo, parece ser mucho más común de los que se planteaba originalmente con base en la caracterización inicial de los genes florales específicos de las funciones A, B y C (Coen and Meyerowitz, 1991). Actualmente sabemos que la mayoría de los genes de esta familia se expresan en varios tejidos, órganos y estados de desarrollo de las plantas (Kofuji *et al.*, 2003; Parenicova *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2005; de Folter *et al.*, 2005), y que la especificidad funcional de los MADS-box podría

depender adicionalmente a su patrón de expresión espacio-temporal, de interacciones proteína-proteína o de otros mecanismos de regulación post-transcripcional (Egea-Cortines et al., 1999; Honma y Goto, 2001; de Folter et al., 2005; Kaufmann et al., 2005; Gregis et al., 2006; Sridhar et al., 2006)

Es importante mencionar que los mutantes de pérdida de función para *XAL1/AGL12* y otros genes MADS-box estudiados en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la UNAM, como *XAL2*, *XAL3* y *AGL17* presentan también un fenotipo con alteraciones en el crecimiento de la raíz, se están realizando cruza entre mutantes de estos genes para generar mutantes múltiples que permitan explorar los fenotipos de pérdida de función y que posiblemente pudieran estar involucrados en la formación de tetrámeros entre las proteínas codificadas por estos genes MADS-box. La generación de líneas que sobre-expresen a varios de estos genes simultáneamente, y la revisión de sus fenotipos sería también de utilidad para corroborar su posible interacción como dímeros o tetrámeros (De Folter et al., 2005).

De acuerdo a los resultados obtenidos posteriormente a este trabajo en el laboratorio, los mutantes MADS-box analizados pueden dividirse principalmente en dos grupos: El grupo 1 (*XAL1*, *XAL2* y *XAL3*) que corresponde a genes con pocos interactores de la misma familia MADS-box y un fenotipo de raíz corta (de Folter et al., 2005; resultados no publicados del laboratorio de la Dra. Alvarez-Buylla) y el grupo 2 (*AGL16*, *AGL20* y *AGL21*) que son genes con numerosos interactores, muchos de ellos comunes entre varias de estas proteínas (Molkentin y Olson 1996; de Folter et al., 2005) y que no presentaron fenotipos obvios. Estudios de interactomas como el de Folter et al., 2005 abrieron la posibilidad de analizar si una misma proteína pudiera formar parte de diferentes complejos que lleven a cabo diferentes funciones en distintos estadios del desarrollo. Además otro gen MADS-box *AGL17* (Hang et al., 2008), también está involucrado en el desarrollo de la raíz, ya que la mutante tiene raíces ligeramente más largas que las silvestres. El hecho de que haya grupos de genes MADS box con numerosos interactores, abre la

posibilidad de que los dímeros que forman sean redundantes en muchas de sus funciones y que su pérdida de función pueda ser compensada por otros dímeros formados por otros miembros de este grupo. Para el caso de XAL1, se ha reportado que puede interactuar con *AGL16*, *AGL21*, *SEP1*, *SOC1*, y *AGL74.N* en ensayos de doble híbrido (Folter *et al.*, 2005), por lo que es conveniente revisar si estas interacciones ocurren en la raíz *in vivo* y cual es su función en el desarrollo.

En los análisis de genes blanco de ciertos genes en genomas completos, se han encontrado varios puntos de unión entre diferentes factores de transcripción, que funcionan en la misma vía o vías de desarrollo relacionadas, lo cual enfatiza la importancia de las redes entre factores de transcripción para la regulación del desarrollo y especificación del destino celular. Se ha identificado que diferentes factores de transcripción forman complejos multiméricos que controlan los cambios de identidad de meristemo floral y funciones del meristemo, así como la formación de patrones y la diferenciación celular (Honma y Goto, 2001; Smith y Hake, 2006; Kanrar *et al.*, 2006).

Las interacciones de los factores de transcripción podrían influir en la selección del sitio de unión al DNA *in vivo*, como se ha sugerido para los complejos en los que forma parte SEP3 (Immink *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2009; Melzer *et al.*, 2009). Las interacciones combinatorias también pueden influenciar las asociaciones con cofactores que afectan la respuesta transcripcional. Por ejemplo, las interacciones entre AP1 y sus contrapartes MADS-box SOC1, SVP y AGL24, que están involucradas en la represión genética a través del reclutamiento de co-represores en la iniciación del meristemo floral (Gregis *et al.*, 2006; Gregis *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). En contraste, el heterodímero AP1-SEP3 parece activar preferencialmente genes de la organogénesis floral (Kaufmann *et al.*, 2010). En conclusión, los datos resultados obtenidos sugieren que este gen y las redes de regulación en las que participa están involucrados en diferentes funciones relacionadas con la formación en los meristemos apicales y esto puede depender de las proteínas con las que interactúa.



### ***Nuevos enfoques que podrían ayudar a entender la función de XAL1 y otros genes MADS-box***

Aunque se han logrado avances importantes en el entendimiento de los mecanismos moleculares que controlan el mantenimiento de las células troncales y la función del meristemo, el escenario de las funciones reguladoras que controlan el crecimiento del meristemo de la raíz ha sido mucho más complejo de lo que originalmente se intuía. Los modelos computacionales de interacciones de diferentes factores transcripcionales y otras proteínas que se han desarrollado recientemente constituyen una de las herramientas importantes para integrar conocimientos y estudiar el papel de las interacciones de los múltiples componentes durante el desarrollo de la raíz, entre otros procesos (Ej., Mendoza y Álvarez-Buylla 2000; Benitez *et al.*, 2011; Benitez *et al.*, 2012). Estos modelos de redes podrían ayudar a dirigir esfuerzos en los experimentos futuros.

Por otro lado, se debe continuar con estrategias de proteómica y genómica que permitan identificar de manera directa las interacciones entre las proteínas con dominio MADS y sus genes blanco, tal como se ha hecho con AG y SEP3 en distintas combinaciones de mutantes (Immink *et al.*, 2009). Estos resultados podrían dar luz acerca de si entre los genes identificados existen algunos involucrados en el crecimiento celular y la regulación del ciclo celular. Sería de vital importancia investigar si las proteínas con dominio MADS fueran un vínculo importante entre la identidad y el crecimiento en respuesta a las hormonas en la raíz.

Según lo reportado por Folter, XAL1 interacciona con AGL16, AGL21, SEP1, SOC1, y AGL74.N (Folter *et al.*, 2005), por lo que es conveniente analizar estas interacciones a nivel genético, en dobles y probablemente triples mutantes de estos genes MADS-box. Los análisis sugeridos consistirían en revisar los fenotipos en tiempo de floración y el desarrollo de raíz. Los resultados obtenidos permitirán

obtener información acerca del papel de distintos dímeros de XAL1 que pudieran estar involucrados en la regulación de ambos procesos de desarrollo.

El análisis de líneas de sobre-expresión de la construcción 35S::XAL1 que generé durante mi doctorado, podría, de igual manera, dar luz a cerca de los interactores de XAL1 y de la suficiencia de este gene para las funciones en las que se le ha caracterizado hasta ahora. Estas líneas se están analizando como parte de nuevos proyectos en laboratorio.

A nivel de la regulación post-transcripcional, nuevos mecanismos de control han sido documentados que se derivan de cambios en la organización de la cromatina que afectan cambios en el desarrollo (He *et al.*, 2011). Resultados recientes indican que los factores de transcripción y los reguladores de la cromatina actúan en conjunto durante el control de la expresión genética durante el desarrollo (Caro *et al.*, 2007; Kaufmann *et al.*, 2010). Son varios los niveles de regulación genética post-transcripcional, incluyendo la señalización celular, el procesamiento del mRNA, la poliadenilación, localización, modificaciones de la cromatina y mecanismos de localización, modificación y degradación de proteínas (He *et al.*, 2007). Recientemente se ha reportado que algunos miembros de la familia MADS-box en plantas están regulados por mecanismos epigenéticos como es el caso de *AG*, *FLC*, *AGL15* y *AGL19* entre otros (Zhang *et al.*, 2007; De Lucia *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2008). Por lo que resultaría sumamente interesante revisar si *XAL1* esta bajo control de algunos de estos mecanismos.

## Referencias Bibliográficas

- Abel S, Theologis A.** (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9–17.
- Acevedo, FG., Gamboa, A., Páez-Valencia, J., Jiménez-García, LF., Izaguirre-Sierra, M., Alvarez-Buylla, E.R.** 2004. FLOR1, a putative interaction partner of the floral homeotic protein AGAMOUS, is a plant-specific intracellular LRR. *Plant Sc.* 167:225-231.
- Adamczyk B.J., y Fernandez D.E.** (2009). “MIKC\* MADS Domain Heterodimers are required for pollen maturation and tube growth in Arabidopsis. *Plant Phys.* 149: 1713-1723.
- Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh YS., Amasino R., y Scheres, B.** (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109–120.
- Aloni R., Aloni E., Langhans M., Ullrich Cl.** (2006). Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta* 23:315-328.
- Alonso-Blanco C. y Koornneef M.** (2000). Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci*, 5:22–29.
- Alvarez-Buylla E.R., Pelaz S., Liljegren S.J., Gold S.E., Burgeff C., Ditta G.S., Ribas de Pouplana L., Martinez- Castilla L., y M.F. Yanofsky.** 2000a. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:5328–5333.
- Alvarez-Buylla ER., Liljegren SJ., Pelaz S., Gold SE., Burgeff C., Ditta GS., Vergara-Silva F. y Yanofsky M.F.** 2000b, MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24:457-466.
- Alvarez-Buylla E.R., García-Ponce B., y Garay-Arroyo A.** (2006). Unique and redundant functional domains of *APETALLA1* and *CAULIFLOWER*, two recently duplicated *Arabidopsis thaliana* floral MADS-box genes. *J. Exp. Biol.* 57:3099-3107.
- Alvarez-Buylla E.R. Benitez M., Corvera-Poire A., Chaos Cador A., de Folter S., Gamboa de Buen A., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes-Miranda F.,**

- Pérez-Ruiz R.V., Piñeyro-Nelson A., y Sánchez-Corrales Y.** (2010). Flower Development, In: *Arabidopsis* Book. 1-57.
- Alvarez-Buylla E.R., Corvera-Poire A., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes-Miranda F., Pérez-Ruiz R.V.** (2011). A MADS view of plant development and evolution. *Trends.com*, 661:181-220.
- Alvarez J., Guli C. L., Yu X.-H. y Smyth D.R.** (1992). *TERMINAL FLOWER*: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2**, 103-116.
- Ambros V.** (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350-355.
- Amasino R.** (2004). Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell*, 16:2553–2559.
- Amasino R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant Journal* 61:1001-1013.
- An H., Roussot C., Suarez-Lopez P., Corbesier L., Vincent C., Pineiro M., Hepworth S., Mouradov A., Justin S., Turnbull C., y Coupland, G.** (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* 131:3615–3626.
- Anderson M., y F. Wilson.** (2000). Growth, maintenance, and use of *Arabidopsis* genetic resources, In: *Arabidopsis: A practical approach*. Edited by Z.A. Wilson. Oxford University Press, 1-28 pp, pp totales 275.
- Andrés F., y Coupland G.** (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Review Genetics* 13: 627-639.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.
- Aarts M.G.M., Dirkse W.G., Stiekema, W.J y Pereira A.** (1993). Transposon tagging of a male-sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* 363:715-717.
- Azpeitia E., Weinstein N., Benitez M., Mendoza L., Alvarez-Buylla E.R.** (2013). Finding missing interactions of the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche gene regulatory network. *Front Plant Sci.* 4:110.
- Bannister A.J., Kouzarides T.** (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21:381-395.
- Bartel B., y Bartel D.P.** (2003). MicroRNAs: At the root of the plant development?.

*Plant Physiol.* 132:709-717.

**Bastow R., Mylne J.S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R.A., y Dean C.** (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* 427:164–167.

**Bäurle I., y Dean C.** (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125:655-664.

**Beddington R.S.P., y Robertson E.J.** (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96:195-209.

**Becker A., Winter K-U., Meyer B., Saedler H., y Theissen G.** (2000). MADS-box gene diversity in seed plants 3000 million years ago. *Mol. Biol. Evol.* 17:1425-1434.

**Benitez M., Monk NAM., y Alvarez-Buylla E.R.** (2011). Epidermal Patterning in *Arabidopsis*: Models Make a Difference. *J. Exp. Zool (Mol. Dev. Evol.)* 316:241-253.

**Benková E., y Hejatko, J.** (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol. Biol.* 69:383-396.

**Benková E., Ivanchenko M.G., Friml J., Shishkova S., y Dubrovsky J.G.** (2009). A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology?. *Trends in Plant Sc.* 14:189-193.

**Bennett T., y Scheres B.** (2010). Root development-two meristems for the price of one?. *Curr. Topics in Develop. Biol.* 91: 67-102.

**Benjamins R., Scheres B.** (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* 59:443–65.

**Berner M., y Grossniklaus U.** (2012). Dynamic regulation of Polycomb group activity during plant development. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 15: 523-529.

**Bey M., Stüber K., Fellenberg K., Schwarz-Sommer Z., Sommer H., Saedler H., y Zachgo S.** (2004). Characterization of *Antirrhinum* Petal Development and Identification of Target Genes of the Class B MADS Box Gene *DEFICIENS*. *Plant Cell* 16: 3197-3215.

**Bishop GJ., y Koncz C.** (2002). Brassinosteroids and plant hormone signaling. *Plant Cell* 14:S97-S110.

**Bishopp A, Benková E, Helariutta Y.** (2011). Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:10–16.

- Blazquez M.A, y Weigel D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 889–892.
- Blazquez, M.A. et al., Ahn J.H., and Weigel D.** (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 33:168–171.
- Blilou I., Xu J., Wildwster M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., y Scheres, B.** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433:39–44.
- Borner R., Kampmann G., Chandler J., Gleißner R., Wisman E., Apel K., y Melzer S.** (2000). A MADS domain gene involved in the transition of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 24:591-599.
- Boss P.K., Bastow R.M., Mylne J.S., Dean C.** (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell (Suppl)* 16: S18–S31.
- Bowman J.L., Smyth D.R., Meyerowitz E.M.** (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1:37-52.
- Bowman J.L., Smyth D.R., Meyerowitz E.M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112:1-20.
- Bowman J.L., Alvarez J., Weigel D., Meyerowitz E.M., Smyth D.R.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* 119:721–743.
- Bowman J.** (1994). Introduction to *Arabidopsis*. En Bowman, J., Editor, *Arabidopsis: An Atlas of morphology and development*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Bradley D., Carpenter R., Sommer H., Hartley N., y Coen E.** (1993). Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientation of a transposon at the *plena* locus of *Antirrhinum*. *Cell* 72:85-95.
- Burgeff C, Liljegren S.J., Tapia-Lopez R., Yanofsky M.F., Alvarez-Buylla E.R.** (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214: 365–372.
- Busch M.A., Bomblies K., y Weigel D.** (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* 285:585-587.

**Carles C.C., y Fletcher J.C.** (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of dynamic balance. *Trends in Plant Sci.* 8:394-401.

**Caro E., Castellano M.M., Gutierrez C.** (2007) A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in *Arabidopsis*. *Nature* 447: 213–217.

**Carpenter R., Coen E.S.** (1990). Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes and Development* 4:1483-1493.

**Casamitjana E., Hofhuis H.F., Xu J., Luis C., Heidstra R., y Scheres, B.** (2003). Root-specific *CLE19* overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CVL-like pathway in the control of *Arabidopsis* root meristem maintenance. *Curr. Biol.* 13:1435-1441.

**Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H.** (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8:165–71.

**Castillejo C., Romera-Branchat M., Pelaz S.** (2005). A new role of the *Arabidopsis* *SEPALLATA3* gene revealed by its constitutive expression. *Plant Journal* 43:586–596.

**Causier B., Schwarz-Sommer, Z., Davies, B.** (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Develop. Biol.* 21:73-79.

**Caradelli M.** (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* 20:1760-1774.

**Chen X., y Myerowitz E.M.** (1999). *HUA1* and *HUA2* are two members of of the Floral Homeotic *AGAMOUS* Pathway. *Molecular Cell* 3:349–360.

**Chen X., Riechman J.L., Dongxaun J., y Meyerowitz E.M.** (2000). Minimal regions in the *Arabidopsis* *PISTILLATA* promoter responsive to the *APETALA3/PISTILLATA* feedback control do not contain a CArG box. *Sex Plant Reprod.* 13:85–94.

**Chen M. y Ni M.** (2006). RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates *CONSTANS* expression and photoperiodic flowering. *Plant Journal* 46: 823-833.

**Ciannamea S., Kaufmann K., Frau, M., Tonaco I.A., Petersen K., Nielsen K.K., Angenent G.C., y Immink R.G.** (2006). Protein interactions of MADS box transcription factors involved in flowering in *Lolium perenne*. *J. Exp. Bot.* 57:3419-3431.

- Clough S.J. y Bent A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 735-743.
- Coen E.S., y Meyerowitz E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-7.
- Corbesier L., y Coupland G.** (2005). Photoperiodic flowering of *Arabidopsis* : integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant, Cell and Environment* 28:54–66.
- Corbesier L., y Coupland G.** (2006). The quest for florigen of recent progress. *J Exp Biol.* 57: 3395–3403.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C., Coupland G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316:1030-1033.
- Cui L., Wall, P.K., Leebens-Mack J.H., Lindsay B.G., Soltis D.E., Doyle J.J., Soltis P.S., Carlson J.E., Arumuganathan K., Barakat A., Albert V.A., Ma H., y de Pamphili C.W.** (2006). Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* 16:738–749.
- Cui H., Levesque M.P., Vernoux T., Jung J.W., Paquette A.J., Gallagher K.L., Wang J.Y., Blilou I., Scheres B., Benfey P.N.** (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316:421–425.
- Davidson, E.H. y Erwin, D.H.** (2006). Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311:796-800.
- Davies P.J.** 1995. In *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (ed. Davies P.J.) Kluwer Academic 1-12.
- Davies B., Egea-Cortines M., de Andrade Silva E., Saedler H., Sommer H.** (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO J.*, 15: 4330-4343.
- Davies S.J.** (2009). Integrating hormones into the floral-transition pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 32:1201-1210.



**De Bodt S., Raes J., Florquin K., Rombauts S., Rouzé P., Thiessen G., y Van de Peer Y.** (2003). Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *J. Mol. Evol.* 56:573-586.

**De Lucas, M. y Brady, S.M.** (2013). Gene regulatory networks in the *Arabidopsis* root. *Curr. Op. in Plant Biol.* 16:50-55.

**de Folter S., Immink RGH., Kieffer M., Pařenicová L., Henz .SR., Weigel D., Busscher M., Kookier M., Colombo L., Kater MM., Davies B. y Angenent G.C.** (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS box transcription factors. *Plant Cell* 17: 1424-1433.

**D Lucía F., Crevillen P., Jones A.M.E., Greb T. y Dean C.** (2008). A PHD–polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 16831–16836.

**Deng W., Ying H., Helliwell C.A., Taylor J.M., Peacock J.M., Dennis ES.** (2011). *FLOWERING LOCUS C (FLC)* regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 108:6680-6685.

**Dennis E.S., y Peacock W.J.** (2007). Epigenetic regulation of flowering. *Curr. Opin in Plant Biol.* 109:520-527.

**Deyholos M.K., y Sieburth L.E.** (2000). Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. *Plant Cell* 12:1799-1810.

**Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN.** (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423–433.

**Depuydt S. y Hardtke C.S.** (2011). Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21:R365-R373.

**Dello Ioio, R., Linhares F. S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., y Sabatini S.** (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17:678–682.

**Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P., y Sabatini, S.** (2008). A genetic framework for the

control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322:1380–1384.

**Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., Yanofsky, M.F.** (2004). The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr. Biol.* 14:1935-1940.

**Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poeting S., Roberts K., Scheres B.** (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 199:71-84.

**Dornelas M.C., Patreze C.M., Angenent G.C., y Immink R.G.H.** (2011) MADS: the missing link between identity and growth?. *Trends in Plant Science* 16:89-97.

**Duarte J.M., Cui L., Wall P.K., Zhang Q., Zhang Q., Zhang X., Leebens-Mack J., Ma H., Altam N. Y dePamphilis C.W.** (2006). Expresión pattern shifts following function in duplicated floral homeotic genes. *Curr. Biol.* 15:1508-1512.

**Dubrovsky J.G, Sauer M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko M.G., Frim, J., Shishkova S., Celenza J., Benková E.** (2008). Auxin acts as a local morphogenic trigger to specific lateral root founder cells. *Proc Natl Sci USA.* 105: 8790-8794.

**Dubrovsky J.G, Soukup A., Napsucialy-Mendivil S., Jenic Z e Ivanchenko M.G.** (2009). The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of Botany* 103:807-817.

**Dunand C., Crèvecoeur M. y Penel C.** (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytologist* 174 :332–341.

**Egea-Cortines M. Saedler H., Sommer H.** (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 18: 5370-5379.

**Egea Gutierrez-Cortines, M., Davies, B.** (2000). Beyond the ABCs: ternary complex formation in the control of floral identity. *Trends Plant Sci.* 5:471-476.

**Ehrenreich I.M., Hanzawa Y., Chou L., Roe J.L., Kover P.X., y Purugganan M.D.** (2009). Candidate gene association mapping of *Arabidopsis* Flowering time. *Genetics* 183: 325-335.

**Espinosa-Soto C., Padilla-Longoria P., y Alvarez-Buylla E.R.** (2004). A gene regulatory network model for fate-cell determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *Plant Cell* 6:2923-2939.

Espinosa-Soto C., Immink R.G.H., Angenet GC., Alvarez-Buylla ER., y de Folter S. (2014). Tetramer formation in *Arabidopsis* MADS domain proteins: analysis of a protein-protein interaction network. *BMC Systems Biol.* 8:1-17.

**Estelle, M.A., y Somerville, C.R.** (1986). The mutants of *Arabidopsis*. *Trends Genet.* 2:89-93.

**Evans M.L., Ishikawa H, Estelle M.A.** (1994). Responses of *Arabidopsis* roots to auxin studied with high temporal resolution—comparison of wildtype and auxin-response mutants. *Planta* 194:215–222.

**Favaro, R., Immink R.G.H., Ferioli V., Bernasconi B., Byzova M., Angenent G.C., Kater M., y Colombo L.** (2002). Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein–protein interactions in monocot and dicot plants. *Mol. Genet. Genomics* 268:152– 159.

**Favaro R., Pinoyiopich A., Battaglia R., Kooiker M., Borghi L., Ditta G., Yanofsky M.F., Kater M.M., y Colombo L..** (2003). MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2603–2611.

**Ferrandiz C., Gu Q., Martienssen R., y Yanofsky M.F.** (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 127:725–734.

**Ferrario S., Immink R.G., Schennikova A., Bussher-Lange J., Angenent G.C.** (2004). Conservation and diversity in flower land. *Curr Opin. Plant Biol.*, 15:914-925.

**Flanagan C.A., y Ma H.** (1994). Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene *AGL2* in wild type and mutant *Arabidopsis* flower. *Plant Mol. Biol.* 26:581-596.

**Fleet C.M., y Tai-Ping S.** (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. in Plant Biol.* 8: 77–85.

**Fowler S., Lee K., Onouchi H., Samach A., Richardson K., Morris B., Coupland G., y Putterill J.** (1999). *GIGANTEA*: A circadian clock controlled gene that

regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* 18:4679-4688.

**Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg G., Scheres B., Jürgens G., et al. (2002).** *AtPIN4* mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108:661–673.

**Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., y Jürgens G. (2003).** Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426:147-153.

**Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R., y Scheres B. (2007).** PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449:1053-1057.

**Galinha C., Bilborough, Tsiantis M. (2009).** Hormonal input in plant meristems: A balancing act. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:1149-1156.

**Gamboa A., Paéz-Valencia J., Acevedo G.F., Vázquez-Moreno L., Alvarez-Buylla E.R. (2001).** Floral transcription factor AGAMOUS interacts in vitro with a leucine-rich repeat and an acid phosphatase complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:1018–1026.

**Garay-Arroyo A., Sánchez M.P., García-Ponce B., Azpeitia E., y Alvarez-Buylla E.R. (2012).** Hormone symphony during root growth and development. *Develop. Dynamics*, 241:1867-1885.

**Goethe J.W. (1790).** Versuch die metamorphose der pflanzen zu erklären. Gothä: CW Ettinger.

**Gómez-Mena C., de Folter S., Costa M.M.R., Angenent G.C., y Sablowski R. (2005).** Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* 132: 429-438.

**Gönczy P. y Rose L. (2005).** Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. In *WormBook* (ed. The C. Elegans Research community).

**González-García M-P., Vilarrasa-Blasi J., Zhiponova M., Divol F., Mora-García S., Russinova E., y Caño-Delgado A.I. (2011).** Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development* 138:849-859.

- Goldstein B. y Macara I.G.** (2007). The PAR proteins: Fundamental players in animal cell polarization. *Developmental Cell*, 13: 609-622.
- Goto K., y Meyerowitz E.M.** (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev.* 8:1548-1560.
- Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater M.M.** (2006). *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:1373–1382.
- Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F., Hogeweg P., y Scheres B.** (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449:1008–1013.
- Gu, Q., Ferrandiz, C. Yanofsky, M. y Marienssen, R.** (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125:1509-1517.
- Guilfoyle T.J., y Hagen, G.** (2007). Auxin response factors. *Curr Op. in Plant Biol.* 10:453-460.
- Han P., García-Ponce B., Fonseca-Salazar G., Alvarez-Buylla E.R., y Yu H.** (2008). *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a *FT*-independent photoperiod pathway. *Plant Journal* (2008) 55, 253–265.
- Hardtke C.S., Ckushumova W., Vidaurre D.P, Singh S.A., Stamatiou G., Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T.J., Berleth T.** (2004). Overlapping and non-functions of the *Arabidopsis* auxin response factors *MONOPTEROS* and *NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4*. *Development* 131:1089-1100.
- Hartmann U., Höhmann S., Nettesheim K., Wisman E., Saedler H., y Huijser P.** (2000). Molecular cloning of *SVP*: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 21: 351-350.
- Hayama R., y Coupland G.** (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Phys.* 135:677-684.
- He C., y Saedler H.** (2007). Hormonal control of the inflated calyx síndrome, a morphological novelty, in *Physalis*. *Plant J.* 49:935-946.

- Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M-T., Benfey PN. (2000). The *SHORT-ROOT* Gene Controls Radial Patterning of the *Arabidopsis* Root through Radial Signaling. *Cell* 101:555-567.
- Helliwell C.A., Wood C.C., Robertson M., Peacock J.W., Dennis E.S.** (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and its part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J.* 46:183-192.
- Hempel F.D., Weigel D., Mandel M.A., Ditta G., Zambryski PC., Feldman L.J., y Yanofsky M.F.** (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development* 124: 3845-3853.
- Heo JB., y Sung S.** (2011). Encoding of winter by noncoding RNAs. *Epigenetics* 6:544-547.
- Henderson I.R., y Jacobsen S.E.** (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418-424.
- Hill T.A., Day C.D., Zondio S.C. Thackeray A.G, Irish V.F.** (1998). Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALLA3*. *Development* 125:1711-1721.
- Honma T., y Goto K.** (2000). The *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* is regulated by discrete cis elements responsive to induction and maintenance signals. *Development* 127:1647-1657.
- Honma T., y Goto K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409:525-529.
- Huang H, Tudor M, Su T, Zhang Y, Hu Y, Ma H.** (1996). DNA binding properties of two *Arabidopsis* MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell* 8:81–94.
- 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.
- Huff, J.T., y Zilberman, D.** (2012). Regulation of biological accuracy, precision, and memory by plant chromatin organization. *Curr. Op. In Genet and Develp.* 22:132-138.
- Immink, R.G., Gadella Jr., T.W., Ferrario, S., Busscher, M., Angenent, G.C.**

(2002). Analysis of MADS box protein–proteína interactions in living plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:2416– 2421.

**Immink R.G., Nougalli Tonaco I.A., de Folter S., Shchennikova A., van Dijk A.D., Busscher-Lange J., Borst JW., y Angenent GC.** (2009). SEPALLATA2: The “glue” for MADS box transcription factors complex formation. *Genome Biol.* 13:430–436.

**Imaizumi, T., Tran, H.G., Swartz, T.E., Briggs, W.R., and Kay, S.A.** (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426, 302–306.

**Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., y Kay, S.A.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* 309:293–297.

**Imaizumi T., y Kay SA.** (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci.* 11: 550–558.

**Imaizumi, T.** (2009). *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 83–89.

**Immink, R.G., Ferrario, S., Busscher-Lange, J., Kooiker, M., Busscher, M., Angenent, G.C.** (2003). Analysis of the petunia MADS-box transcription factor family. *Mol. Genet. Genomics* 268:598– 606.

**Inzé D., y De Veylder L.** (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40:77-105.

**Irish, V.** (2006). Duplication, diversification, and comparative genetics of angiosperms MADS-box genes. In Developmental Genetics of the flower), *Advances in Botanical Research*, 44 (Soltis D.E. et al. eds.). Elsevier. Vol. pp 130-151.

**Ito T., Wellmer F., Yu H., Das P., Ito N., Alves-Ferreira M., Riechman J.L., y Meyerowitz E.M.** (2004). The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*. *Nature* 430:356-360.

**Ivanchenko, M.G., Muday, G.K., Dubrovsky, J.G.** 2008. Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55:335-347.

**Jack T., Brockmann L.L., y Meyerowitz E.M.** (1992). The homeotic gene

*APETALLA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 68:683-697.

**Jack, T.** (2001). Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends Plant Sci.* 6:310–316.

**Jürgens G.** (1995). Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell* 81:467-470.

**Kaufmann K., Melzer R., Theissen G.** (2005). MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347:183-198.

**Kaufmann K., Muiño J.M, Jauregui R., Airoidi CA., Smaczniak C., Krajewski P., y Angenent G.C.** (2009). Target genes of the MADS transcription factor *SEPALLATA3*: Integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower. *PLoS Biol* 7:e1000090.

**Kaufmann K, Wellmer F., Muiño J.M., Ferrier T., Wuest S.E., Kumar V., Serrano-Mislata, A., Madueño F., Krajewski, Meyerowitz E.M., Angenent G.C., y Riechmann J.L.** (2010). Orchestration of floral initiation by *APETALA1*. *Science* 328:85–89.

**Kempin S.A., Savidge B., y Yanofsky M.F.** (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science* 267: 522-525.

**Kende, H., y Zeevart, J.A.D.** (1997). The five “classical” plant hormones. *Plant Cell* 9:1197-1210.

**Kim, S., Yoo M.J., Albert V.A., Farris J.S., Soltis P.S., y Soltis D.E.** (2004). Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: evolutionary and functional implications of a 260-million year old duplication. *Am. J. Bot.* 91:2102-2118.

**Kim, Dong-Hwan, Doyle M.R., Sung, S., y Amasino R.M.** (2009). Vernalization: Winter and the timing of flowering in plants. *Annu. Rev Cell. Dev. Biol.* 25: 277-299.

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

**Kobayashi Y., y Weigel D.** (2007). Move on up, it's time for change-Mobile signals



controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* 21:2371-2384.

**Kofuji R., Sumikawa N., Yamasaki M., Kondo K., Ueda K., Ito M., y Hasebe M.** (2003). Evolution and divergence of MADS-box gene family base don genome-wide expression analysis. *Mol. Biol. Evol.* 20:1963-1977.

**Komeda Y.** 2004. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:521-535.

**Koornneef, M., Hanhart, C.J., y Van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological, analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 229:57–66.

**Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart, C.J., y Peeters, A.J.** (1998). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 148:885–892.

**Koornneef M., Alonso-Blanco C., Vreugdenhil D.** (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55:141-172.

**Koornneef M., y Meinke, D.** (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal*, 61: 909-921.

**Köhler C., y Makarevich G.** (2006) Epigenetic mechanisms governing seed development in plants. *EMBO Rep.* 7:1223-1227.

**Kramer E.M, Jaramillo M.A., Di Stilio V.S.** (2004). Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the *AGAMOUS* subfamily of MADS box genes in angiosperms. *Genetics* 166:1011-23.

**Křeček P., Skůpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., y Eva Zažímalová.** (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol.* 10:249(1)-249(11).

**Krizek B.A., y Meyerowitz E.M.** (1996). *The Arabidopsis* homeotic genes *APETALLA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development* 122: 11-22.

**Kuzoff R.K., y Gasser C.D.** (2000). Recent progress in reconstructiing angiosperm phylogeny. *Trends Plant Sci.* 5:330-336.

**Langercrantz U.** (2009). And the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiodic responses in plants?. *J Exp. Bot.* 69:2501-2515.

- Langridge J.** (1957). Effect of Day-length and Gibberellic Acid on the Flowering of *Arabidopsis*. *Nature* 180:36–37.
- Lau S., De Smet I., Kolb M., Meinhardt H., y Jürgens G.** (2011). Auxin triggers a genetic switch. *Nature Cell Biol.* 13:611-615.
- Lee I., Woilfe D.S., Nilsson O., y Wigdel D.** (1997). A *LEAFY* co-regulator encoded by *UNUSAUL FLORAL ORGANS*. *Curr. Biol.* 7:95-104.
- Lenhard, M., Bonhert A., Jürgens G., y Laux T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* 105:805-808.
- Letswaart, R., Wu Zhe y Dean C.** (2012). Flowering time control: another windows to the connection between antisense RNA and chromatin. *Cell* 28:445-453.
- Levesque M.P., Vernoux T., Busch W., Cui H., Wang J.Y., Blilou I., Hassan H., Nakajima K., Matsumoto N., Lohmann J.U., Scheres B., Benfey P.N.** (2006). Whole-genome analysis of the *SHORT-ROOT* developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 4:e143.
- Leyser O.** (1998). Auxin signaling: protein stability as a versatile control target. *Curr Biol.* 8:R305-R307.
- Li, R.** (2013). The art of choreographing asymmetric cell division. *Developmental Cell* 25: 439-450.
- Liljegren S.J., Ditta G.S., Eshed Y., Savidge B., Bowman J.L., y Yanofsky M.F.** (2000). *SHATTERPROOF* MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404:766-770.
- Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S. y Yanofsky, M.F.** (1999) Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *Plant Cell* 11:1007–1018.
- Liu C., Chen H., Er H., Soo H.M., Kumar P.P., Han J.H., Liou Y.C., y Yu H.** (2008). Direct interaction of *AGL24* y *SOC1* integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development* 135:1481-1491.
- Lynch M., y Force A.** (2000). The probability of duplicated gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154:459-473.

- Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M., Busch M.A., Parcy F., Simon R., y Weigel D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 105:793-803.
- Jun L., Yuehui H., Amasino R., y Chen X.** (2004). siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 18:2873-2878.
- Ma H., Yanofsky M.F., Meyerowitz E.M.** (1991). *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev.* 5:484–495.
- Mandel M.A., Gustafson-Brown C., Savidge B., Yanofsky M.F.** (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360:273–277.
- Mandel M.A., Yanofsky M.F.** (1998). The *Arabidopsis* *AGL9* MADSbox gene is expressed in young flower primordia. *Sex Plant Reprod.* 11: 22-28.
- Mannervik M.** (1999). Target genes of homeodomain proteins. **BioEssays** 21: 267-270
- Marsch-Martínez N., Greco R., Van Arkel G., Herrera-Estrella L., y Pereira A.** (2002). Activation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 795-805.
- Masiero S., Colombo L., Grini P.E., Schnittger A., y Kater M.M.** (2011). The Emerging Importance of Type I MADS Box Transcription Factors for Plant Reproduction. *Plant Cell* 23: 865-872.
- Martínez-Castilla L.P., y Alvarez-Buylla E.R.** (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 13407–13412.

**Matsubayashi Y., y Sakagami Y.** (1996). Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7623-7627.

**Matsuzaki Y., Ogawa-Osnishi M., Mori A., y Matsubayashi Y.** (2010). Matsuzaki secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science* 329:1065-1067.

**Megeney, L.A., y Rudniki, M.A.** (1995). Determination versus differentiation and the Myo family of transcription factors. *Biochem. and Cell Biol.* 73: 723-732.

**Melzer, R., y Theissen, G.** (2009). Reconstitution of “floral quartets” in vitro involving class B and class E floral homeotic proteins. *Nucleic. Acids Res.* 37:2123-2736.

**Mendoza L., y Alvarez-Buylla E.R.** (1998). Dynamics of the genetic regulatory network of *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. *J. Theor. Biol.* 193:307-319.

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

**Meyerowitz E.M. y Pruitt R.E.** (1985). *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* 229: 1214-1218.

**Meyerowitz E.M.** (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56: 263-269.

**Michaels S.D., y Amasino R.M.** (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11:949–956.

**Michaels S.D, Amasino R.M.** (2000) Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ* 23:1145–1153.

**Michaels S.D, Amasino R.M.** (2001) Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* 13:935–941.

**Mitchell-Olds, T.** (2001). *Arabidopsis thaliana* and its wild relatives: a model system for ecology and evolution. *Trends in Ecol & Evol.* 16:693-700.

**Mizukami Y., y Ma H.** (1992). Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity. *Cell* 71:119-131.

- Molkentin J.D., y Olson E.N.** (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9366-9373.
- Moubayidin L., Perilli, S., Dello Iorio R., Di Mambro R., Constantino, P., Sabatini, S.** (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Curr. Biol.* 20:1138-1143.
- Moubayidin L., Di Mambro R., Sozzani R., Pacifici E., Salvi E., Terpstra I., Bao D., van Dijken A., Dello Iorio R., Perilli S. et al.** (2013). Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Dev Cell* 26:405-415.
- Mouradov A., Cremer F., y Coupland G.** (2002). Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell (Suppl)* 14: S111–S130
- Mutasa-Göttgens E., y Hedden P.** (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot.* 60:1979-1989.
- Nesi N., Debeaujon I, Jond C., Stewart A.J., Jenkins G.I. Caboche M., Lepiniec L.** (2002) *TRANSPARENT TESTA16* locus encodes the *Arabidopsis* B-SISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* 14: 2463–2479.
- Ng M., y Yanofsky M.F.** (2001). Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by APETALA1. *Plant Cell* 13: 739-753.
- Nordborg M., y Weigel D.** (2008). Next-generation genetics in plants. *Nature* 456: 720-723.
- Norman C., Runswick M., Pollock R., y Treisman R.** (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding *SRF*, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55:989-1003.
- Notaguchi M., Abe M., Kimura T., Daimon Y., Kobayashi T., Yamaguchi A., Yomita T., Dohi K., Masashi M., y Araki T.** (2008). Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* 49:1645-1658.
- Ortega-Martínez O., Pernas M., Carol R.J., y Dolan, L.** (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317, 507–510.
- Ohshima S., Murata M., Sakamoto W., Ogura Y., y Motoyoshi F.** (1997). Cloning

and molecular analysis of the *Arabidopsis* gene *TERMINAL FLOWER 1*. *Mol. Gen. Genet.* 254:186-194.

**Ossowski S., Schneeberger K., Clark R.M., Lanz C., Warthmann N., Weigel D.** (2008). Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. *Genome Res.* 18:2024-2033.

**Pagnussat G.C., Alandere-Saez M., Bowmann J.L., Sundaresan V.** (2009). Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science* 324:1684-1689.

**Parcy F., Nilsson O., Busch M.A., Lee I., y Weigel D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* 129:2519-2527.

**Parenicová L., de Folter S., Kieffer M., Horner D.S., Favalli C., Busscher J., Cook H.E., Ingram R.M., Kater M., Davies B., et al.** (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15: 1–15.

**Passmore S., Maine GT., Elble R., Christ C., y Tye B.K.** (1988). *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT alpha cells. *J. Mol. Biol.* 204:593-606.

**Pelaz S., Ditta G.S., Baumann E. Wismann E., Yanofsky M.F.** (2000). B and C floral identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* 405: 200-203.

**Pelaz S., Gustafson-Brown C., Kohalmi S.E., Crosby W.L., Yanofsky M.F.** (2001). APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. *Plant J.* 26:385– 394.

**Pelaz S., Tapia-López R., Alvarez-Buylla E.R., Yanofsky M.F.** (2001). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 11:182-184.

**Peel A. D., Chipman A. D. y Akam M.** (2005). Arthropod segmentation: Beyond the *Drosophila* paradigm. *Nature Rev. Genetics* 6:9065-9160.

**Pellegrini L., Song T., Richmond T.J.** (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* 376:490–498.

**Penel C., y Dunand C.** (2009). Signaling via plant peroxidases, in: *Signaling in plants; Signaling and communication in plants*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 155-171.

- Perilli S., Di Mambro, R. Sabatini, S.** (2012). Growth and development of the root apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:17-23.
- Pigliucci M.** 1998. Ecological and evolutionary genetics of *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sci.* 3:485-489.
- Pinyopich A., Ditta G.S., Savidge B., Liljegren S.J., Bauman E., Wisman E., Yanofsky M.F.** (2003). Assessing of redundant of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* 424: 85-88.
- Piwarzyk E, Yang Y.Z, Jack T.** (2007). Conserved C-terminal motifs of the *Arabidopsis* proteins APETALA3 and PISTILLATA are dispensable for floral organ identity function. *Plant Physiol.* 145:1495–1505.
- 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., Macknight R.** (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* 26: 363–373.
- Poethig, R.S.** (2009). Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19:374–378.
- Ratcliffe O.J., Bradley D.J., y Coen E.S.** (1999). Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development* 126:1109-1120.
- Ratcliffe O.J., Nadzan G.C., Reuber T.L., y Riechman J.L.** (2001). Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an *FLC* homologue. *Plant Phys.* 126:122-132.
- Rédei G.P.** (1962). Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 47:443-460.
- Reeves P.H, Coupland G.** (2000). Response of plant development to environment: control of flowering by day. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 37–42.
- Reményi A., Schöler H.R., y Wilmanns M.** (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology* 11:812-815.
- Rhee S.Y., Beavis W., Beardini T.Z., Chen G., Dixon D., Doyle A., et al.** (2003). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralised, curated gateway to *Arabidopsis* biology, research materials and community. *Nucleic Acids Research* 31:224-228.

**Rhoades M., Reinhardt B., Lim L., Burge C., Bartel B., y Bartel D.** (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513-520.

**Riechmann J.L., Krizek B.A., Meyerowitz E.M.** (1996). Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 93:4793–4798.

**Riechman J.L., Meyerowitz E.M.** (1997). MADS domain proteins in plant development. *Biol Chem.* 378: 1079-1101.

**Riechmann J.L., Meyerowitz E.M.** (1997). Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. *Mol. Biol. Cell.* 8:1243–1259.

**Riechmann J.L., Herad J., Martin G., Reuber L., Jiang C-Z., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O.J., Samaha R.R., et al.** (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukariotes. *Science* 290:2105-2110.

**Riechmann J.L., Ratcliffe O.J.** (2000b). A genomic perspective on plant trascription factors. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 3:423-434.

**Rijkema A.S., Gerats T., Vandenbussche M.** (2007). Evolutionary complexity of MADS complexes. *Curr Opin. Plant Biol.* 10: 32–38.

**Rose L.S., y Kempthues K.J.** (1998). Early patterning of the *C. elegans* embryo. *Annu. Rev. Genet.* 32:521–545.

**Rouse D.T, Sheldon C.C., Bagnall D.J., Peacock J., Dennis E.S.** (2002). *FLC*, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. *Plant J.* 29: 183–191.

**Ruiz-Rosquete M., Barbez E., Kleine-Vehn J.K.** (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant* 5:772-786 .

**Rounsley S.D., Ditta G.S., y Yanofsky M.F.** (1995). Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. *Plant Cell* 7:1259-1269.

**Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold N., Weisbeek P., y Scheres, B.** (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99:463-472.



- Sabatini S., Heidstra R., Wildwater M., Scheres B.** (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev.* 17:354-358.
- Sablowski R.W.M., y Meyerowitz E.M.** (1998). A homolog *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALLA3/PISTILLATA*. *Cell* 92:93-103.
- Samach A., Onouchi H., Gold S.E., Ditta G.S., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky M.F., y Coupland, G.** (2000). Distinct roles of *CONSTANS* targets genes in reproductive development in *Arabidopsis*. *Science* 288: 1613-1616.
- Santner A. y Estelle M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* 459: 1071-1078.
- Santner A. Calderon-Villalobos I.A., Estelle M.** (2009). Plant hormones are versatile Chemicals regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5: 301-307.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., y Laux T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446:811–814.
- Savidge B., Rounsley S.D., y Yanofsky M.F.** (1995). Temporal relationship between the transcription of the two *Arabidopsis* MADS-box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* 7:721-733.
- Sawa M., Nusinow D.A., Kay S.A., y Imaizumi T.** (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 328:261-265.
- Scheres B., Di Laurenzio L., Willemsen V., Hauser M.T., Janmaat K., Weisbeek P., Benfey P.N.** (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53–62.
- Scheres B.** (2001). Plant cell identity. The role of position and linaje. *Plant Physiol.* 125:112-114.
- Scheres B.** (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:345–354.
- Schlereth A., Möller B., Liu W., Kientz M., Flipse J., Rademacher E.H., Schmid**

**M., Jürgens G., y Weijers D.** (2010). MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature* 464:913-917.

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

**Schmitz R.J., Amasino R.M.** (2007). Vernalization: A model for investigating epigenetics and eucariotic gene regulation in plants. *Biochi. Biophys Acta* 1769:269-275.

**Schwarz-Sommer Z., Hue I., Huijser P., Flor P.J., Hansen R., Tetens F., Lönning WE., Saedler H., y Sommer H.** (1992). Characterization of *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene deficiencies: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression through flower development. *EMBO J.* 11:251-263.

**Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H., Sommer H.** (1990). Genetic control of flower development: homeotic genes of *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931-936.

**Scutt C.P., Vinauger-Douard M., Fourquin C., Finet C., Dumas C.** (2006). An evolutionary perspective on the regulation of carpel development. *J. Exp. Bot.* 57:2143–2152.

**Searle I., He, Y., Turck F., Vincent C., Fornara F., Krober S., Amasino R.A., y Coupland G.** (2006). The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20:898–912.

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

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

**Shilo B.Z., Haskel-Ittah M., Ben-Zvi D., Schejter E.D., y Barkai N.** (2013). Creating gradients by morphogen shuttling. *Cell* 29: 339-347.

**Sheldon C.C., Burn J.E., Perez P.P., Metzger J., Edwards J.A., Peacock W.J., y Dennis E.S.** (1999). The *FLF* MADS-box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* 11:445-458.

Shore P.I., y Sharrocks A.D. (1995). **The MADS-Box Family of Transcription Factors.** *FEBS J.* 29:1-13.

**Sieburth L.E., y Meyerowitz E.M.** (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region that shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* 9:355-365.

**Simpson G.G., Gendall A.R., y Dean C.** (1999). When to switch to flowering. *Annu. Rev. Cell Dev.* 99:519-550.

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

**Smaczniak C., Immink R.G.H, Muiño J.M, Blanvillain R., Busscher M., Busscher-Lange J., Dinh Q.P., Liu S., Westphal A.H., Boeren S., Parcy F., Xu L., Carles C.C., Angenent G.C., Kaufmann K.** (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:1560–1565.

**Smaczniak C., Immink R.G.H., Angenent G.C., Kaufmann K.** (2012). Developmental and evolutionary diversity of plants domain factors: insights from recent studies. *Development* 139:3081-3098.

Smalle J., y Vierstra R.D. (2004). **The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway.** *Ann. Rev. of Plant Biol.* 55:555-590.

**Smyth D.R., Bowman J.L., y Meyerowitz E.M.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2:755-767.

**Smyth D.** (2000). A reverse trend-MADS functions revealed. *Trends in Plant Sci.* 5: 315-317.

**Soltis D.E., Ma H., Frohlich M.W., Soltis P.S., Albert V.A., Oppenheimer D.G., Altam N.S., de Pamphilis C., y Leebens-Mack J.** (2007a). The floral genome: an evolutionary store of gene duplication and shifting patterns of gene expression. *Trends Plant Sc.* 12:358-367.

**Soltis D.E., Chaderbali A.S., Kim S., Buzgo M., Soltis P.S.** (2007b). The ABC model and its applicability to basal angiosperms. *Ann. Bot.* 100: 155-163.

**Somerville C. & Koornneef M.** (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics* 3:883-889.

**Song Y.H., Ito S., Imaizumi T.** (2010). Flowering time regulation photoperiod-and temperature-sensing in leaves. *Cell* 18:575-583.

**Sozzani R., Cui H., Moreno-Risueno M.A., Busch W., Van Norman J.M., Vernoux T., Brady S.M., Dewitte W., Murray J.A.H. y Benfey P.N.** (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466:128-132.

**Sozzani R. y Lyer-Pascuzzi A.** (2014). Postembryonic control of root meristem growth and development. *Curr. Op. In Plant Biol.* 17:7-12.

**Sparks E., Wachsman G., y Benfey P.** (2013). Spatiotemporal signalling in plant development. *Nature Reviews Genetics* 14.631–644.

**Sridhar V.V., Surendrarao A., Liu Z.** (2006). APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development* 133:3159–3166.

**Srikanth A., y Schmid M.** (2011). Regulation of flowering time: all roads led to Rome. *Cell and Mol. Life Sci.* 68:2013-2037.

**Stahl Y., Wink RH., Ingram GC., Simon R.** (2009) A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr. Biol.* 19, 909–914

**Stepanova A. N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L.M., Xie D.Y., Dolezal K., Schlereth A., Jürgens G., y Alonso J. M.** (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–191.

**Stepanova A.N., Yun J., Robles L.M., Novak O., He W., Guo H., Ljung K., y Alonso J.M.** (2011). The *Arabidopsis* *YUCCA1* flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* 23:3961-3973.

**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.

**Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., van der Straeten D., Beemster G.T., Sandberg, G., Bhalerao R., Ljung K., y Bennett M. J.** (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19:2186–2196.

- Taiz L. y Zeiger E.** (2006). *Plant Physiology*. Sunderland, MA: Sinauer associates Inc., 374 pp.
- Teale W.D., Paponivm I.A., y Palme K.** (2006). Auxin in action: Signalling, transport, and the control of plant growth and development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:847-859.
- Theissen G., Kim J.T., 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., Becker A., di Rosa A., Kanno A., Kim J.T., Münster T., Winter K., y Saedler H.** (2000). A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 42:115–149.
- Theissen G.** (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:75–85.
- Theissen G., y Becker A.** (2004). Gymnosperm orthologues of class B floral homeotic genes and their impact on understanding flower origin. *Crit. Rev. Plant Sci.* 23:129–148.
- Theissen G., y Saedler H.** (2001). Plant biology. Floral quartets. *Nature* 409:469–471.
- Tilly J.J., Allen D.W., Jack T.** (1998). The CarG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALLA3* mediate diverse regulatory effects. *Development* 125-1657.
- Tröbner W., Ramirez I., Motte P., Huijser P., Lönning W., Saedler H., Sommer H., y Schwarz-Sommer Z.** (1992). *GLOBOSA*: a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO J.* 11:4693-4704.
- Tsukagoshi H., Busch W., y Benfey P.N.** (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143:606-616.
- Turk F., Fornara F., y Coupland G.** (2008). *Regulation and identity of florigen*: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu. Rev. of Plant Biol.* 59: 573-594.

- Tzeng T.Y., Liu H.C., Yang C.H.** (2004). The C-terminal sequence of *LMADS1* is essential for the formation of homodimers for B function proteins. *J. Biol. Chem.* 279:10747–10755.
- Valverde F., Mouradov A., Soppe W.J., Ravenscroft D., Samach A., y Coupland G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303:1003–1006.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hage W., Weisbeek P., y Scheres B.** (1995). Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signaling. *Nature* 378:62-65.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks G., Weisbeek P., y Scheres B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390:287–289.
- Vandenbussche M., Zethof J., Royaert S., Weterings K., Gerats T.** (2004). The duplicated B-class heterodimer model: whorl-specific effects and complex genetic interactions in *Petunia hybrida* flower development. *Plant Cell* 16:741-754.
- Vanstraelen, M., y Benkova, E.** (2012). Hormonal interactions in regulation of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28:22.1-22.25.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., y Friml J.** (2007). Molecular and celular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 12:160-168.
- Vision T.J., Brown D.G., y Tanksley S.D.** (2000). The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* 290:2114-2117.
- Wagner D., Sablowski R.W.M, Meyerowitz E.M.** (1999). Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science* 285:582–584.
- Weber H.** (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trens in Plant Science* 7:217-224.
- Weigel D., Alvarez J., Smydth D., Yanofsky M.F., y Meyerowitz E.M.** (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69:843-859.
- Weigel D. y Meyerowitz E.M.** (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* 78: 203-209.
- Weigel D., y Jürgens G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* 415:751–754.
- Weigel D. y Mott R.** 2009. The 1001 genomes project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology* 10:107-111.

- Weijers D., Schlereth A., Ehrismann J.S., Schwank G., Kientz M., Jürgens G.** (2006). Auxin trigger transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Dev. Cell* 10:265-270.
- Welch D., Hassan H., Blilou I., Immink R., Heidstra R., Scheres B.** (2007). *Arabidopsis* JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting *SHORT-ROOT* action. *Genes Dev.* 21:2196–2204.
- Wells D.M., Wilson M.H., y Benett M.J.** (2010). Feeling *UPBEAT1* about growth: Linking ROS gradients and cell proliferation. *Develop. Cell*, 16: 644-646.
- Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., Le Gourrierec J., Samach A., y Coupland G.** (2006). *CONSTANS* and the CCAAT Box Binding Complex Share a Functionally Important Domain and Interact to Regulate Flowering of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 18:2971–2984.
- West A.G., Causier B.E., Davies B., Sharrocks A.D.** (1998). DNA binding and dimerisation determinants of *Antirrhinum majus* MADS-box transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 26:5277–5287.
- Wieschaus E., Nusslein-Volhard, C., y Kluding H.D.** (1984). *Krüppel*, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation. *Developmental Biol.* 104: 172-186.
- Wienkoop S., Gabinsky S., Weckwerth W.** (2010). *Arabidopsis thaliana* as a model organism for plant proteome research. *J. of Proteomics* 73:2239-2248.
- Wigge P.A., Kim K.E., Jaeger M.C., Busch W., Schmid M., Lohmann J.U., y Weigel D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during induction in *Arabidopsis*. *Science* 309: 1056-1059.
- Willige B.C., Isono E., Richter R., Zourelidou M., Schwechheimer C.** (2011). Gibberellin regulates *PIN-FORMED* abundance and is required for auxin transport-dependent growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23:2184-2195.
- Wilson R.N., Heckman J.W. y Somerville C.R.** (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology* **100**, 403–408.
- Yamada M., y Sawa S.** (2013). The roles of peptide hormones during plant root

development. *Curr Op. In Plant Biol.* 16:56-61.

**Yamaguchi A., Kobayashi Y., Goto K., Abe M. y Araki, T.** (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant Cell Physiol.* 46:1175–1189.

**Yamaguchi A. y Abe, M.** (2012). Regulation of productive development by non-coding RNA in Arabidopsis: to flower or not to flower. *J. Plant Res.* 125:693-704.

**Yang, Y., Fanning, L., Jack, T.** (2003). The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA. *Plant J.* 33: 47–59.

**Yanofsky M.F., Ma H., Bowman J.L., Drews G.N., Feldman K.N., Meyerowitz E.M.** (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* resembles transcription factors. *Nature* 346:35–40.

**Yanovsky M.J., y Kay S.A.** (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:265–275.

**Yant, L. Mathieu, J., y Schmid, M.** (2009). Just say no: floral repressors help *Arabidopsis* bide the time. *Curr. Opin. In Plant. Biol.* 12:580-586.

**Yamaguchi S.** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:225–251.

**Yang Y., Jack T.** (2004). Defining subdomains of the K domain important for protein–protein interactions of plant MADS proteins. *Plant Mol. Biol.* 55:45–59.

**Yoo S.K., Lee J.S., y Ahn J.H.** (2006). Overexpression of *AGAMOUS-LIKE 28* (*AGL28*) promotes flowering by upregulating expression of floral promoters within the autonomous pathway. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 348:929-936.

**Yu H., Wellmer F., Meyerowitz E.M.** (2004). Repression of *AGAMOUS-LIKE 24* is a crucial step in promoting flower development. *Nat. Genet.* 36:157-161.

**Zachgo S., de Andrade Silva E., Motte P., Tröbner W., Saedler H., Schwarz-Sommer Z.** (1995). Functional analysis of the *Antirrhinum* floral homeotic *DEFICIENS* gene in vivo and in vitro by using a temperature-sensitive mutant. *Development* 121:2861–2875.

**Zahn L.M., Kong H., Leebens-Mack J.H., Kim S., Soltis P.S., Landherr L.L., Soltis DE., de Pamphilis P.S., y Ma H.** (2005). The evolution of the *SEPALLATA*



subfamily of MADS-box genes: a pre-angiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. *Genetics* 169:2209-223.

**Zahn, L.M., et al.**, (2006). Conservation and divergence in the *AGAMOUS* subfamily of MADS-box genes: evidence for independence sub- and neofunctionalization events. *Evol. Dev.* 8:30-45.

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

**Zhang W. Swarup R., Bennett M., Schaller E., Kieber J.J.** (2013). Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the *Arabidopsis* root apical meristem. *Curr. Biol.* 23:1979–1989

**Zhao, Y.** (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:49–64.

**Zhu, Q-H. y Wang, M.B.** (2012). Molecular functions of non-coding RNAs in plants. *Genes* 3:176-190.

**Zik M., y Irish V.F.** (2003). Global identification of target genes regulated by *APETALLA3* and *PISTILLATA* floral homeotic gene action. *Plant Cell* 15:207-222.

## **Páginas WEB**

1001genomes.org [<http://www.1001genomes.org>]

TAIR [<http://www.arabidopsis.org>]

<http://www.ice.mpg.de/departments/Gen/wild.htm>

## ***Apendice 1***

**S. Pelaz, R. Tapia-Lopez, E.R. Alvarez-Buylla, M.F. Yanofsky.** (2001). Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Current Biology* **11**:182-184.

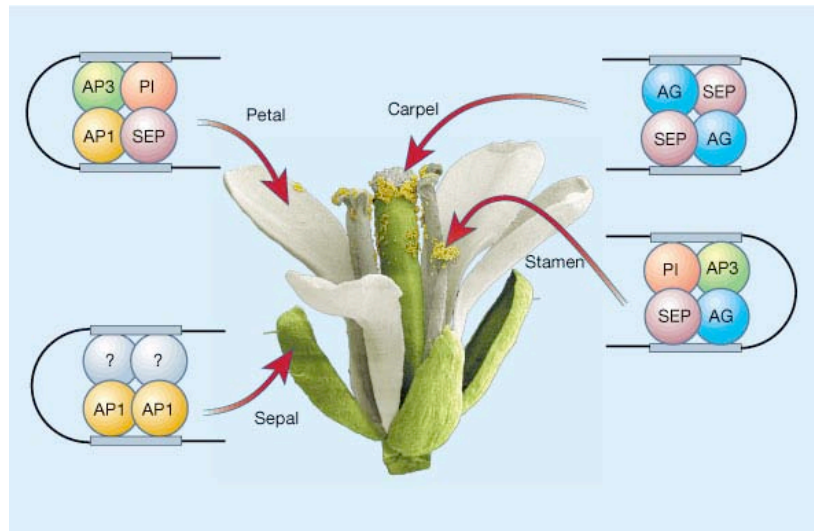
El artículo del apéndice I, trata a cerca de los mecanismos moleculares que controlan la iniciación y el desarrollo de flores y frutos en plantas superiores, en el sistema modelo de *Arabidopsis*. Dentro de este estudio, se reportaron nuevos reguladores de la identidad de órganos florales lo que constituyó un punto clave en el desarrollo floral y corresponden a 3 de los genes de la familia *MADS*-box, los genes *SEPALLATA* (*SEP*) y los resultados reportados ayudaron a contestar la pregunta a cerca qué genes son los modificadores que transforman las hojas en órganos florales.

Hace aprox 200 años Johann Wolfgang von Goethe propuso que las diferentes partes de una planta resultan de la “metamorfosis” (transformación) de un órgano básico, la “hoja ideal” (Coen, 2001; Dornelas y Dornelas, 2005) . Las bases que apoyan esta hipótesis vienen de estudios genéticos, los cuales han permitido identificar a los genes que se requieren para la determinación de la identidad de órganos florales. Estos genes han sido incorporados en el modelo ABC ampliamente aceptado, el cual trata de explicar la identidad de los órganos florales, este modelo puede ser aplicable para eudicotiledóneas distantemente relacionadas así como para monocotiledóneas. Sorprendentemente mutantes triples de las actividades ABC producen hojas en lugar de órganos florales, demostrándose con este resultado que estos genes se requieren para la identidad de éstos. Sin embargo, los genes ABC no son suficientes para conferir la identidad de órganos florales, ya que su expresión ectópica no convierte hojas vegetativas en órganos florales. Con este dato se presume que más factores son requeridos. Anteriormente se demostró que los genes *SEPALLATA* (*SEP*) representan una nueva clase de genes de identidad de órgano floral ya que la pérdida de su actividad resulta en la transformación de todos los órganos florales en sépalos. En el artículo anexo se demostró que la acción combinada de

los genes *SEP*, junto con los genes A y B es suficiente para convertir hojas en pétalos (Pelaz et al., 2001).

Nuestro trabajo de forma inicial y otros estudios de forma casi simultánea y posteriores (Honma and Goto 2001), dieron la pauta para proponer a los integrantes de una nueva función involucrada en el desarrollo floral, la función E, y de ahí se propone una modificación del modelo ABC de identidad de órganos florales (Egea y Davies, 2000). En este modelo, las proteínas MADS-box involucradas en la identidad de órganos florales forman distintos complejos en cada uno de los cuatro verticilos. La formación de estos complejos parece ser un requerimiento indispensable que resulta en la regulación transcripcional específica de ciertos genes blanco. A partir de los estudios realizados, se derivaron en importantes modificaciones al Modelo ABC, en el que los genes *SEPALLATA* juegan un papel muy importante, y forman parte de la función E (Theissen, 2001; Theissen y Saedler, 2001).

Los resultados que se han ido sumando a lo largo de unos años en el estudio de los genes *SEP* permitieron obtener pruebas de la importancia de estos genes en la formación de heterodímeros y de complejos multiméricos o “higher-order” entre diferentes proteínas MADS, así como en la identificación de sus genes blanco Figura 2 (Parenicová et al, 2003; Ferrario et al., 2003; Causier et al., 2005; Moore et al., 2005; Tonaco et al 2006; Espinosa et al. 2014).



**Modelo del cuarteto de interacciones entre proteínas involucradas en la formación de órganos florales y los genes SEPALLATA (Tomada de Tiessen, 2001).**

## Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*

Soraya Pelaz<sup>†</sup>, Rosalinda Tapia-López<sup>\*</sup>, Elena R. Alvarez-Buylla<sup>\*</sup>  
and Martin F. Yanofsky<sup>†</sup>

**More than 200 years ago, Goethe proposed that each of the distinct flower organs represents a modified leaf [1]. Support for this hypothesis has come from genetic studies, which have identified genes required for flower organ identity. These genes have been incorporated into the widely accepted ABC model of flower organ identity, a model that appears generally applicable to distantly related eudicots as well as monocot plants. Strikingly, triple mutants lacking the ABC activities produce leaves in place of flower organs, and this finding demonstrates that these genes are required for floral organ identity [2]. However, the ABC genes are not sufficient for floral organ identity since ectopic expression of these genes failed to convert vegetative leaves into flower organs. This finding suggests that one or more additional factors are required [3, 4]. We have recently shown that *SEPALLATA* (*SEP*) represents a new class of floral organ identity genes since the loss of *SEP* activity results in all flower organs developing as sepals [5]. Here we show that the combined action of the *SEP* genes, together with the A and B genes, is sufficient to convert leaves into petals.**

Addresses: <sup>\*</sup>Instituto de Ecología and Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, México. <sup>†</sup>Section of Cell and Developmental Biology, University of California at San Diego, La Jolla, California 92093, USA.

Correspondence: Martin F. Yanofsky  
E-mail: marty@ucsd.edu

Received: 8 December 2000  
Accepted: 18 December 2000

Published: 6 February 2001

**Current Biology** 2001, 11:182–184

0960-9822/01/\$ – see front matter  
© 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

### Results and discussion

*Arabidopsis* plants produce a number of closely spaced rosette leaves during the vegetative phase. Upon the transition to flowering, the internode length increases, and this event causes a significant increase in the distance that separates the last few vegetative (cauline) leaves. The flowers are composed of four whorls of organs, with sepals in the first, or outermost, whorl, petals in the second whorl, stamens in the third whorl, and carpels occupying the fourth whorl, in the center. The simple and elegant

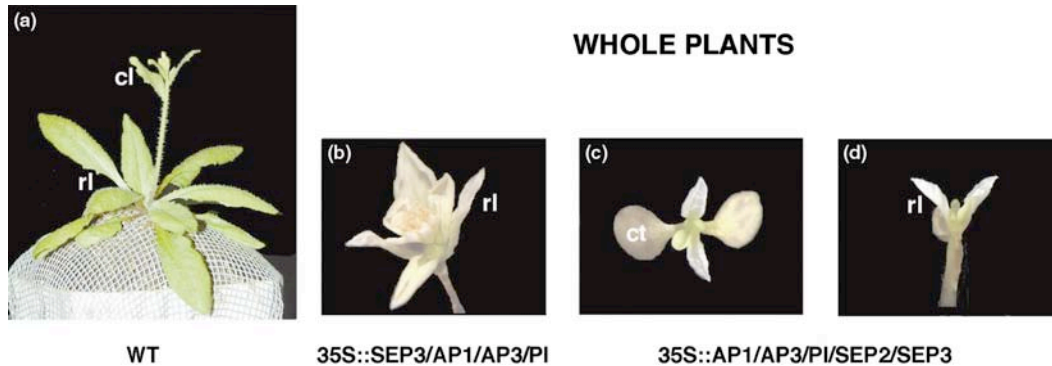
ABC model of flower development was proposed to explain the activity of the floral organ identity genes [2, 6]. According to the model, the combined actions of three different functions, each one active in two adjacent whorls, is responsible for the development of the four types of organs of a typical eudicot flower. The model suggests that A alone specifies sepals, C alone specifies carpels, and the combined activities of AB and BC specify petals and stamens, respectively.

In *Arabidopsis*, *APETALA1* (*AP1*) and *APETALA2* (*AP2*) are the A function genes, *APETALA3* (*AP3*) and *PISTILLATA* (*PI*) are the B function genes, and *AGAMOUS* (*AG*) is the only C function gene. With the exception of *AP2*, all of these genes are members of the MADS-box family of transcription factors, whose expression patterns correspond to their domains of action (reviewed in [7, 8]). Triple mutants that carry mutations in the A, B, and C functions have a conversion of all floral organs into leaf-like organs, and this observation supports the idea that floral organs represent modified leaves [1] and that the ABC genes are necessary to convert leaves into flower organs [2]. However, ectopic expression studies indicate that the ABC genes are not sufficient to convert vegetative leaves into flower organs [3, 4].

A new class of floral organ identity MADS-box genes, *SEP1*, *SEP2*, and *SEP3*, was recently described [5, 9, 10]. This trio of largely redundant genes is required for the development of petals, stamens, and carpels since triple mutants lacking all three *SEP* activities produce flowers that consist only of sepals [5]. This phenotype is similar to that of mutants lacking both the B and C activities and suggests that the *SEP* gene products are required for B and C gene activity. To determine if the *SEP* genes are the missing factors required for the conversion of leaves into flower organs, we generated transgenic plants that ectopically express one or more of the *SEP* genes in combination with the A (35S::AP1) and B (35S::AP3, 35S::PI) organ identity genes. If the *SEP* genes represent the missing factors, then we would expect that the ectopic expression of the A and B genes, together with the *SEP* genes, will convert leaves into petals.

Previous studies in which both B genes were constitutively expressed showed a slight conversion of the cauline leaves toward petals, whereas the rosette leaves at the base of the plant remained largely unaffected [4]. Similarly, constitutive expression of the A function gene, 35S::AP1, alone did not alter the identity of leaves [11]. However, when the 35S::AP1 transgene, or any of the 35S::SEP

Figure 1



Conversion of leaves into petals. **(a)** Wild-type plant after the transition to reproductive development with numerous rosette leaves (rl) at its base and an extended inflorescence stem with cauline leaves (cl) and flowers arising at the apex. **(b)** Whole plant that has the 35S::SEP3/

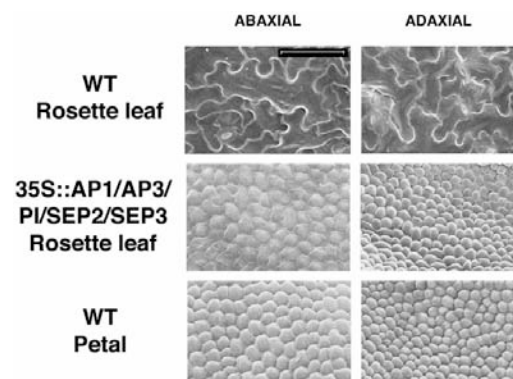
AP1/AP3/PI transgenes shows petaloid organs replacing all rosette leaves. **(c,d)** Whole plant with the 35S::SEP2/SEP3/AP1/AP3/PI transgenes shows petals in place of rosette leaves. "ct" indicates the cotyledon.

transgenes, is combined with the 35S::AP3 and 35S::PI transgenes, the conversion of cauline leaves toward petals is increased (data not shown). In fact, these cauline leaves are whiter and adopt a shape that is more similar to petals, although the cells of these cauline leaves retain many features common to leaves. In addition, the vegetative rosette leaves are only slightly affected; only a chalky color appears on the distal part of these curly leaves (not shown).

When the 35S::SEP2 and 35S::SEP3 transgenes (S. P., C. Gustafson-Brown, S. E. Kohalmi, W. L. Crosby, and M. F. Y., submitted) are combined with plants that constitutively express *API*, *AP3*, and *PI*, a complete conversion of rosette leaves into petals was observed, with the exception of three trichomes on the edges of these organs. Analyses of these bright-white rosette "petals" by scanning electron microscopy (SEM; [5]) revealed that cells on the abaxial (lower) surface of these converted organs closely resembled cells on the abaxial (outer) surface of normal petals (Figure 2). Similarly, cells on the adaxial (upper) surface of these converted organs closely resemble adaxial (inner) petal cells. Taken together, these results demonstrate that the combined action of the *SEP* genes, together with the A and B genes, is sufficient to convert vegetative rosette leaves into petals. We also found that the introduction of both 35S::SEP2 and 35S::SEP3 transgenes into plants that constitutively expressed the A and B transgenes produced a more complete transformation of rosette leaves into petals than did similar plants that contained only one of the two *SEP* transgenes (not shown). However, this likely reflects a difference in copy number and, hence, a difference in transgene expression levels since the genes appear to act in a largely redundant manner.

We have shown that the *SEP* genes, when combined with the A and B organ identity genes, are sufficient to convert vegetative rosette leaves into petals. Recent studies have indicated that ternary complexes of MADS-box proteins occur [12, 13], and this finding suggests that direct protein-protein interactions between the *SEP* proteins and the ABC organ identity gene products may determine organ

Figure 2



Scanning electron micrographs reveal the characteristic cell types on the abaxial and adaxial surfaces of wild-type (WT) rosette leaves and petals. Petal cells are very small and round, whereas leaf cells are comparatively large, irregular, and flat with interspersed stomata that are never present in petals. Cells on the abaxial and adaxial surfaces of the rosette leaves of 35S::SEP2/SEP3/AP1/AP3/PI transgenic plants closely resemble those on wild-type petals. The scale bar represents 50  $\mu$ m.

fate. Because orthologs of the *SEP* genes have been described in eudicots [14–17], monocots [18], and gymnosperms [19], it seems likely that the interactions of the *SEP* genes with the ABC genes have been largely conserved in distantly related plant species.

### Materials and methods

The 35S::SEP2 construct was generated by polymerase chain reaction from the *SEP2* cDNA by the use of primers with BamHI restriction sites. The primers used were the following: OEAB200, 5'-CCGGATCCATG GGAAGAGGAAAGAGTAG-3' and OEAB201, 5'-GGGGATCCTCAC AGCATCCAGCCAGG-3'. The PCR product was cloned into pGEM-T Easy (Promega) and then digested with BamHI for subsequent cloning into pBIN-JIT [20]. The constructs were confirmed by sequencing. The 35S::SEP2 construct was introduced into *Arabidopsis*, ecotype *Columbia*, by vacuum infiltration [21]. Transgenic plants were selected on kanamycin plates. Plants were grown under continuous light at 23°C–25°C.

### Acknowledgements

We thank Pietro Ciceri and Lars Østergaard for comments on the manuscript; Beth Krizek for the 35S::AP3 and 35S::PI seeds; and Cheryl Wiley and Chika Kawashima for technical assistance. This work is supported by grants from the National Institutes of Health, the National Science Foundation, and the United States Department of Agriculture (to M. F. Y.) and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Universidad Nacional Autónoma de México) (to E. R. A.-B.). E. R. A.-B. was a PEW fellow, and R. T.-L. received Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Estudios de Posgrado (Universidad Nacional Autónoma de México) fellowships.

### References

1. von Goethe JW: **Versuch die metamorphose der pflanzen zu erklären.** Gotha, Germany: C. W. Ettinger; 1790.
2. Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM: **Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*.** *Development* 1991, **112**:1-20.
3. Mizukami Y, Ma H: **Ectopic expression of the floral homeotic gene *AGAMOUS* in transgenic *Arabidopsis* plants alters floral organ identity.** *Cell* 1992, **71**:119-131.
4. Krizek BA, Meyerowitz EM: **The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function.** *Development* 1996, **122**:11-22.
5. Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF: **B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes.** *Nature* 2000, **405**:200-203.
6. Coen ES, Meyerowitz EM: **The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development.** *Nature* 1991, **353**:31-37.
7. Riechmann JL, Meyerowitz EM: **MADS domain proteins in plant development.** *Biol Chem* 1997, **378**:1079-1101.
8. Jofuku KD, den Boer BGW, Van Montagu M, Okamoto JK: **Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*.** *Plant Cell* 1994, **6**:1211-1225.
9. Ma H, Yanofsky MF, Meyerowitz EM: ***AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes.** *Genes Dev* 1991, **5**:484-495.
10. Mandel MA, Yanofsky MF: **The *Arabidopsis* *AGL9* MADS-box gene is expressed in young flower primordia.** *Sex Plant Reprod* 1998, **11**:22-28.
11. Mandel MA, Yanofsky MF: **A gene triggering flower development in *Arabidopsis*.** *Nature* 1995, **377**:522-524.
12. Egea-Cortines M, Saedler H, Sommer H: **Ternary complex formation between the MADS-box proteins *SQUAMOSA*, *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*.** *EMBO J* 1999, **18**:5370-5379.
13. Egea-Cortines M, Davies B: **Beyond the ABCs: ternary complex formation in the control of floral organ identity.** *Trends Plant Sci* 2000, **5**:471-476.
14. Davies B, Egea-Cortines M, de Andrade Silva E, Saedler H, Sommer H: **Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins.** *EMBO J* 1996, **15**:4330-4343.
15. Angenent GC, Franken J, Busscher M, Weiss D, van Tunen AJ: **Co-suppression of the petunia homeotic gene *fbp2* affects the identity of the generative meristem.** *Plant J* 1994, **5**:33-44.
16. Pnueli L, Hareven D, Broday L, Hurwitz C, Lifschitz E: **The *TM5* MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers.** *Plant Cell* 1994, **6**:175-186.
17. Kotilainen M, Elomaa P, Uimari A, Albert VA, Yu D, Teeri TH: ***GRCD1*, an *AGL2*-like MADS box gene, participates in the C function during stamen development in *Gerbera hybrida*.** *Plant Cell* 2000, **12**:1893-1902.
18. Kang H-G, An G: **Isolation and characterization of a rice MADS box gene belonging to the *AGL2* gene family.** *Mol Cells* 1997, **7**:45-51.
19. Mouradov A, Glassick TV, Hamdorf BA, Murphy LC, Marla SS, Yang Y, et al.: **Family of MADS-box genes expressed early in male and female reproductive structures of Monterey pine.** *Plant Physiol* 1998, **117**:55-62.
20. Ferrándiz C, Liljegren SJ, Yanofsky MF: **Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development.** *Science* 2000, **289**:436-438.
21. Bechtold N, Ellis J, Pelletier G: **In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants.** *C R Acad Sci* 1993, **316**:1194-1199.

**Tabla de Motivos del Promotor de XAL1**

<b>Motivo (No. Copias)</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Función putativa</b>
ARFAT (1)	TGTCTC	**Auxin response factors**
ASF1MOTIFCAMV (2)	TGACG	Activation of genes by auxin/salicylic acid; light regulation; root tip
AUXREPSIAA4 (1)	KGTCCCAT	Auxin responsive element
CATATGGMSAUR (10)	CATATG	Auxine response modules; Auxin responsiveness
GGTCCCATGGNSAUR (1)	GGTCCCAT	Auxin response modules
CAREOSREP1 (6)	CAACTC	GA-upregulated proteinase expression
GADOWNAT (1)	ACGTGTC	GA biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination
GARE1OSREP1 (2)	TAACAGA	GA-responsive element
GARE2OSREP1 (1)	TAACGTA	GA-upregulated proteinase expression
GAREAT (10)	TAACAAR	GA-upregulated proteinase expression
MYBGAHV (8)	TAACAAA	MYB/Central element of GA response complex/GA-MYB
PYRIMIDINEBOXHVEPB1 (1)	TTTTTTCC	Pyrimidine box/Gene expression regulated by GA&ABA
PYRIMIDINEBOXRAMY1A (8)	CCTTTT	Sugar repression/ GA-response-cis-element of GARE and pyrimidine box
WRKY71OS (30)	TGAC	WKRY repressor of the GA signaling
ABREATRD22 (1)	RYACGTGGYR	ABA responsive element
ABRELATERD1 (5)	ACGTG	Dehydration stress and dark induce senescence
ACGTABREMOTIFA2OSEM (22)	ACGT	Dehydration stress and dark induce senescence
DPBFCOREDCDC3 (10)	ACACNNG	ABA-responsive/leucine zipper transcription factor
MYB2CONSENSUSAT (10)	YAACKG	MYB/ABA
MYB1AT (10)	WAACCA	MYB recognition site/ ABA signaling
MYB2AT (5)	TAACGT	MYB recognition sequence/dehydration stress
MYBCORE (15)	CNGTTR	MYB/ Dehydration
MYCATERD1 (3)	CATGTG	Dehydration stress/dark include senescence
MYCATRD22 (3)	CACATG	MYC/ABA induction
MYCCONSensusAT (36)	CANNTG	MYC/Dehydration- responsive
EBOXBNNAPA (36)	CANNTG	NapA storage-protein promoter
NAPINMOTIFBN (2)	TACACAT	Napin/2S albumin



ERELEE4	(3)	AWTTCAA	Ethylene responsive element
BOXCPSAS1	(3)	CTCCCAC	Light-induced transcription repression
DRECTRCOREAT	(1)	RCCGAC	Transcription activators in drought, high salt, and cold responsive gene expression
GATABOX	(44)	GATA	GATA-BOX/Light switches
GT1CONSENSUS	(62)	GRWAAW	Light regulation transcription; GT element
GTCORE	(2)	GGTTAA	GT-elements; Light regulated transcription
IBOX	(1)	GATAAG	Light regulated genes
IBOXCORE	(15)	GATAA	Light regulated transcription
IBOXCORENT	(1)	GATAAGR	Light-responsive promoter region
REALPHALGLHCB21	(8)	AACCAA	Phytochrome regulatory elements
INRNTPSADB	(14)	YTCANTYY	Light responsive transcription
ACGTBOX	(2)	TACGTA	Sugar repression
CGACGOSAMY3	(2)	CGACG	Alpha-amylase/Sugar starvation
WBOXHVISO1	(3)	TGACT	Sugar signaling
CCAATBOX1	(15)	CCAAT	Heat shock element
EVENONGAT	(2)	AAAATATCT	Circadian clock
PREATPRODH	(4)	ACTCAT	Hypo-osmolarity-responsive expression
ACGTOSGLUB1	(1)	GTACGTG	Endosperm expression
CANBNNAPA	(2)	CNAACAC	Endosperm-specific transcription
CARGCW8GAT	(14)	CWWWWWWW WG	Binding site for AGL15
LEAFYATAG	(1)	CCAATGT	Target of LEAFY in the intron of <i>AGAMOUS</i> / <i>WUSHEL</i> homeo
WUSATAg	(2)	TTAATGG	Target sequence of WUS in the intron of <i>AGAMOUS</i>
DOFCOREZM	(108)	AAAG	Dof transcription factors
GT1GMSCAM4	(14)	GAAAAA	GT-motif/ GT-transcription factor
CAATBOX1	(1)	CAAT	Vascular expression
GT1CONSENSUS	(62)	GRWAAW	GT-element
GT1GNSCAM4	(16)	GAAAAA	GT-Transcription factor
TATABOX2	(3)	TATAAAT	TATAbbox/tissue specific promoter
TATABOX3	(6)	TATTAAT	TATAbbox/ Sporamin A gene
TATABOX4	(12)	TATATAA	TATAbbox/Sporamin A gene/ $\beta$ -phaseolin

TATABOX5	(9)	TTATTT	TATAbox/ Glistamine synthetase
TATAPVTRNALEU	(4)	TTTATATA	TATA like motif

([http:// www.dna.affrc.go.jp/PLACE;](http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE;)  
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>,  
<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)

## **Resultados no incluidos en publicaciones**

A continuación se describen brevemente otros experimentos realizados a los largo de éste proyecto así como algunos de los resultados obtenidos.

### ***Búsqueda y selección de alelos mutantes***

La búsqueda de los alelos de *xal1* se realizó a partir de diferentes colecciones o bancos de mutantes, a continuación se describen brevemente :

Colección de Elvira Baumann y Ellen Wisman (Max Planck

Alemania), alelo seminulo en Col W12.2-1:***xal1-1***, mutación casi al final de primer exón.

- Colección GabyKat (Instituto Max-Planck-Alemania); alelo GK177402, con mutación en promotor, sin fenotipo evidente.
- Colección Salk (Instituto Salk-California-USA); alelo 51118, con mutación en intrón II, sin fenotipo evidente.
- Colección NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center); alelo en Ler 429367=N05=***xal1-2***. Mutación nula en intrón II.
- Colección del Dr. Andy Pereyra (Wageningen-Holanda); alelo nulo Ag12-1=***xal1-3***, mutación al inicio de 5 exón. Se analizaron varios alelos hasta que se encontró al nulo.

Los alelos mutantes que finalmente se analizaron tanto por su expresión nula, como su fenotipo en raíz y con floración tardía fueron *xal1-1* y *xal1-2* y *xal1-3*.

### ***Patrones de expresión de XAL1 bajo diferentes condiciones y en diferentes órganos.***

Aunque *XAL1-AGL12* había sido originalmente reportado como específico de raíz (Rounsley et al 1989; Burgeff et al., 2001), después del análisis inicial del fenotipo mutante, en el que encontramos alteración en el tiempo de floración, se decidió revisar cuidadosamente la expresión de *XAL1* en toda la planta. Se realizaron dos tipos de experimentos. El primero consistió en analizar la expresión por RT-PCR de *XAL1* a partir de plántulas Col/Wt, y se encontró la mayor expresión a partir de los días 12-22 (Figura 1 Resultados anexos). Utilizamos como referencia la expresión de

*AP1*, el cual es uno de los genes de la cual se detecto en plántulas a partir del día 10 a niveles muy bajos.

El segundo experimento fue analizar la expresión de *XAL1* por hibridación *in situ* en diferentes órganos de la planta, se encontró que también se expresa en inflorescencias, flores y frutos, tricomas y meristemos apicales y florales (Figura 1 Resultados Anexos).

▪

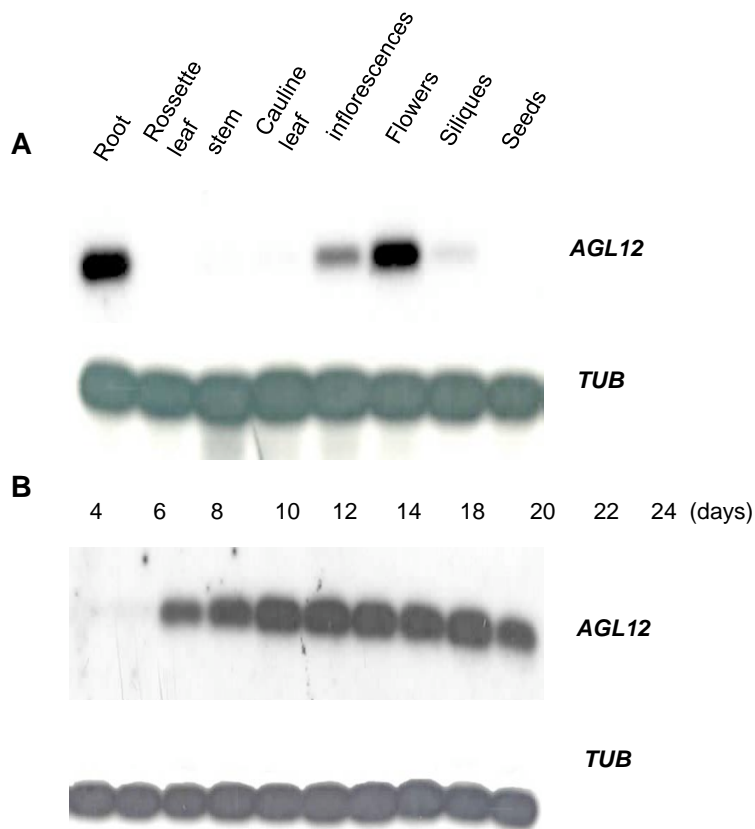


Figura 1RA.  
Patrones de expresión de *XAL1/AGL12* en diferentes tejidos (A),  
y su inducción a diferentes tiempos de desarrollo (B).

### **Relación de XAL1 con las GA's**

A partir de una revisión bibliográfica de mutantes en otras especies que presentaban defectos en las raíces y tamaño de las plantas que presentaban fenotipos similares a *xal1*, en arroz se encontró que mutantes afectadas en el tamaño de la planta y raíces presentaban defectos en la rutas de biosíntesis o señalización de Giberelinas (GAs). Por lo que se analizó la expresión de *XAL1* en la vía de síntesis de GAs. Se analizaron 8 genes involucrados en la biosíntesis, y respuesta a GAs: GA20x (At2g34555), GA2ox1 (At1g30040), GAI3 (At4g02780), GA3ox  $\beta$  (At1g80340), RGA (At1g14920), RGA2 (At2g01570), SPY (At3g11540), GAL3 (At4g02780) y no se detectaron diferencias significativas que pudieran indicar que *XAL1* afecta las vías de síntesis o señalización de GAs. Datos no mostrados.

### **Generación de líneas de sobre-expresión de XAL1.**

Se desarrollaron líneas de sobreexpresión de *XAL1* con el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor CAmV35S (35S). Se obtuvo el cDNA de *XAL1* por RT-PCR a partir de los primers que tenían los sitios de restricción BamHI en sus extremos. Se clonaron los productos de PCR en el plásmido pGEM-T Easy (Promega), generándose la construcción RT150 en *E. coli Top10*, y la selección de las transformantes fue con IPTG-GAL4. Se aislaron los plásmidos y se digirieron con BamHI, el fragmento obtenido y se clonó en el vector binario pBIN-JIT que lleva dos copias del promotor 35S. Una vez corroborada la secuencia, con esta construcción se transformó por electroporación a la cepa AGL0 de *Agrobacterium tumefaciens* y las transformantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina. Con ésta cepa se transformó por infiltración a *Arabidopsis thaliana* ecotipo Co-Wt.

La transformantes Kan<sup>R</sup> se siguieron hasta la generación T3, y fue con líneas de ésta generación con las que se realizó el análisis preliminar del fenotipo. Sin embargo, en las líneas analizadas no se detectaron fenotipos contrastantes en cuanto al tamaño de la raíz y la floración con respecto a las líneas mutantes de *xa1*. Se sugiere revisar un mayor número de éstas líneas.

Es importante mencionar que bajo esta misma metodología se construyeron líneas de sobreexpresión en *Arabidopsis* de los genes *AGL19* y *AGL21*, las cuales en su momento fueron llamadas RT153 y RT155, respectivamente.