



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Papel de *XAANTAL1* en la transición de la floración
de *Arabidopsis thaliana*, en respuesta al
fotoperiodo de día largo y temperatura elevada.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ROBERTO DOMÍNGUEZ ADÁN



DIRECTORA DE TESIS
Dra. BERENICE GARCÍA
PONCE DE LEÓN

CDMX
México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas; Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Berenice García Ponce de León.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN203214-3; IN203814 e IN211516 y de CONACyT: 240180 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Elena Alvarez-Buylla, María de la Paz Sánchez y Adriana Garay Arroyo a quienes les agradecemos su apoyo.

Todo este trabajo es dedicado para mis padres quienes siempre han estado para mí y me han guiado a lo largo de toda mi vida, a mis hermanas que desde muy pequeño me han apoyado y dado la mano cuando las necesito.

Quiero agradecer a la Dra. Berenice García por toda la enseñanza y paciencia que me brindo en la realización de este trabajo. También agradezco a todas esas personas que han estado para mi a lo largo de mi formación, a Ciara por toda la diversión y cariño que trae a mi vida, a Charly (chess norris) por todas sus enseñanzas y su amistad, a todos mis amigos del hoyo funky, house of pain y del pulpo por siempre hacerme pasar un buen rato y sacarme sonrisas.

ALL YOU NEED IS LOVE.

1967

THE BEATLES

Contenido

Resumen.....	1
1.INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 LOS MERISTEMOS APICALES AÉREOS.....	3
1.1.1 GENES DE IDENTIDAD DE LOS MERISTEMOS DE INFLORESCENCIA Y DE FLOR.....	10
1.2 TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN.....	12
1.2.1 SEÑALIZACIÓN POR EL FOTOPERIODO DE DÍA LARGO.....	13
1.2.2 TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN EN RESPUESTA A LA ALTA TEMPERATURA.....	20
1.3 LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES MADS-BOX EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.....	22
2. ANTECEDENTES.....	25
2.1 XAL1 EN LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN.....	25
3.JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	32
5. OBJETIVO GENERAL.....	32
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6. MÉTODOS.....	33
6.1 LÍNEAS DE PLANTAS UTILIZADAS.....	33
6.2 CRECIMIENTO DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>	33
6.3 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	34
6.3.1 GENOTIPIFICACIÓN Y ELECTROFORESIS.....	35
6.4 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	36
6.5 RT-PCR.....	37
6.6 EXPRESIÓN DE XAL1 A LO LARGO DE LAS HORAS DE LUZ.....	38
6.7 TIEMPO DE FLORACIÓN DE LAS PLANTAS SILVESTRES Y MUTANTES A 27 °C.....	39
6.8 GENERACIÓN DEL DOBLE MUTANTE <i>ft xal1</i>	39
7. RESULTADOS.....	42
7.1 XAL1 INCREMENTA SU EXPRESIÓN A LO LARGO DEL DÍA.....	42
7.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES QUE PARTICIPAN EN LA SEÑALIZACIÓN EN RESPUESTA AL FOTOPERIODO DE DÍA LARGO EN EL DOBLE MUTANTE <i>co xal1</i> COMPARADO CON PLANTAS SILVESTRES Y SUS PARENTALES.....	44
7.3 GI NO ES UN REGULADOR DE XAL1.....	46

7.4 EL DOBLE MUTANTE <i>ft xal1</i> ES LETAL.....	48
7.5 ANÁLISIS DEL TIEMPO DE FLORACIÓN EN PLANTAS SILVESTRES Y EN LOS MUTANTES <i>xal1, co</i> Y <i>co xal1</i> A 27°C.....	49
7.6 FENOTIPO DE LA ROSETA DE INDIVIDUOS MUTANTES.....	51
7.7 PIF4 NO REGULA LA EXPRESIÓN DE <i>XAL1</i> Y ESTE A SU VEZ NO INDUCE A <i>FT</i> EN RESPUESTA A LA TEMPERATURA ELEVADA.....	52
8. DISCUSIÓN.....	54
8.1 EXPRESIÓN DE <i>XAL1</i> A LO LARGO DEL DÍA.....	54
8.2 PAPEL DE <i>XAL1</i> EN LA RED DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA FLORACIÓN EN CONDICIONES DE FOTOPERIODO DE DÍA LARGO.....	56
8.3 EL DOBLE MUTANTE <i>ft xal1</i> ES LETAL.....	57
8.4 <i>XAL1</i> EN LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN EN RESPUESTA A LA TEMPERATURA ELEVADA.....	59
9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

RESUMEN.

Los genes MADS-box son factores transcripcionales y componentes clave en la red de regulación transcripcional de la transición a la floración y del desarrollo de las flores. Por trabajos previos sabíamos que uno de estos genes MADS-box, *XAANTAL1* (*XAL1*) participa como inductor de la floración en respuesta al fotoperiodo de día largo al igual que *CONSTANS* (*CO*), que es un gen que tiene una regulación transcripcional circadiana, y regula positivamente a *XAL1*. En este trabajo se observó que *XAL1* tiene diferentes niveles de expresión a lo largo del día, siendo las 9 horas de luz el pico de acumulación del ARNm. Por otra parte, demostramos que *GIGANTEA* (*GI*) que es un regulador positivo de *CO*, no induce a *XAL1*. También analizamos los posibles genes blancos de *XAL1* en la red de regulación de la floración para lo cual comparamos la expresión de *FT*, *SOC*, *LFY* y *API* entre plantas silvestres, los mutantes sencillos *xa1* y *co*, así como el doble mutante *co xa1*. El doble mutante tiene un fenotipo de floración tardía y la expresión de estos genes no ayudo a explicar el fenotipo por lo que otros genes desconocidos deben de ser los blancos de *XAL1* y *CO*.

Puesto que el fotoperiodo de día largo está ligado a un aumento en la temperatura ambiental en los lugares donde crece naturalmente *Arabidopsis*, también analizamos el papel de *XAL1* en la transición a la floración en respuesta a la temperatura elevada (27°C) y encontramos que el mutante *xa1* es de floración tardía en esta condición, indicando que *XAL1* forma parte de la red de regulación que integra diversas señales para inducir la floración.

Para ahondar en la regulación genética de *XAL1*, se generó el doble mutante *ft-10 xa1-2*, pero no pudimos analizar su tiempo de floración ya que el doble homocigoto resultó ser letal. Este resultado es interesante ya que se desconoce el posible papel de *XAL1* y *FT* en el desarrollo embrionario.

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas son la base del equilibrio de los ecosistemas del planeta y el entendimiento de su desarrollo y fisiología es intrínsecamente importante para el bienestar de los seres humanos (Alvarez-Buylla, et al. 2011). Por eso, desde hace siglos se ha tenido interés en comprender el crecimiento, la fisiología y la evolución de las plantas angiospermas.

Durante el ciclo de vida de las angiospermas la reproducción sexual asegura la producción de semillas para perpetuar a la especie y el desarrollo de las flores como unidades reproductivas ha contribuido a su éxito evolutivo. Incluso puede considerarse la producción de semillas como el evento evolutivo más importante en la historia de este linaje, permitiéndoles distribuirse en el planeta, adaptándose a todo tipo de condiciones (Alvarez-Buylla, et al. 2011; Seosamh, et al. 2013). Como consecuencia, las plantas han tenido que coordinar procesos de desarrollo en tiempos particulares detectando diferentes condiciones ambientales a lo largo del año para asegurar la producción de semillas.

La transición a la floración se define como el momento en el que el desarrollo vegetativo cesa y se transita a un estado reproductivo mediante la formación del meristemo de inflorescencia (MI) que posteriormente dará lugar a los meristemas florales (MF). De este modo el tiempo en el que ocurre la floración es cuando se presentan las condiciones más favorables que confieran ciertas ventajas a la progenie

(Jackson, 2008). La transición a la floración se ha estudiado ampliamente en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* pero sigue sin ser completamente comprendida. Por esta razón, el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la transición a la floración a nivel genético son de mucha importancia.

1.1 LOS MERISTEMOS APICALES AÉREOS.

Tanto las plantas como los animales proceden de una única célula huevo o cigoto que se divide para formar un embrión, el cual mantiene un conjunto de células escasamente diferenciadas que se dividen y las células derivadas de las primeras, se diferencian y especializan en los tejidos del organismo vegetal o animal (Paniagua, et al. 2002). Sin embargo en las plantas a diferencia de los animales, el desarrollo embrionario es un proceso inacabado que establece los meristemos apicales aéreo y de la raíz, a partir de los cuales se van a generar post-germinación todos los órganos de la planta adulta, gracias a su capacidad de división y diferenciación (Paniagua, et al. 2002).

En *Arabidopsis*, los patrones de desarrollo embrionario han sido ampliamente estudiados y se han descrito cuatro estadíos: el primero, es el estado globular. En el segundo estadío, la célula apical va a iniciar varias divisiones ordenadas formando un conjunto de ocho células (octante). Durante el tercer estadío, el número de células se incrementa haciendo que el embrión entre al estadío de corazón, que se forma

gracias a las rápidas divisiones celulares que se dan en dos regiones a ambos lados del futuro ápice del brote. Por último, el eje embrionario se alarga y se desarrollan los cotiledones. Después de la embriogénesis la semilla entra en un estado de baja actividad metabólica (Figura 1; Taiz y Zeiger, 2002).

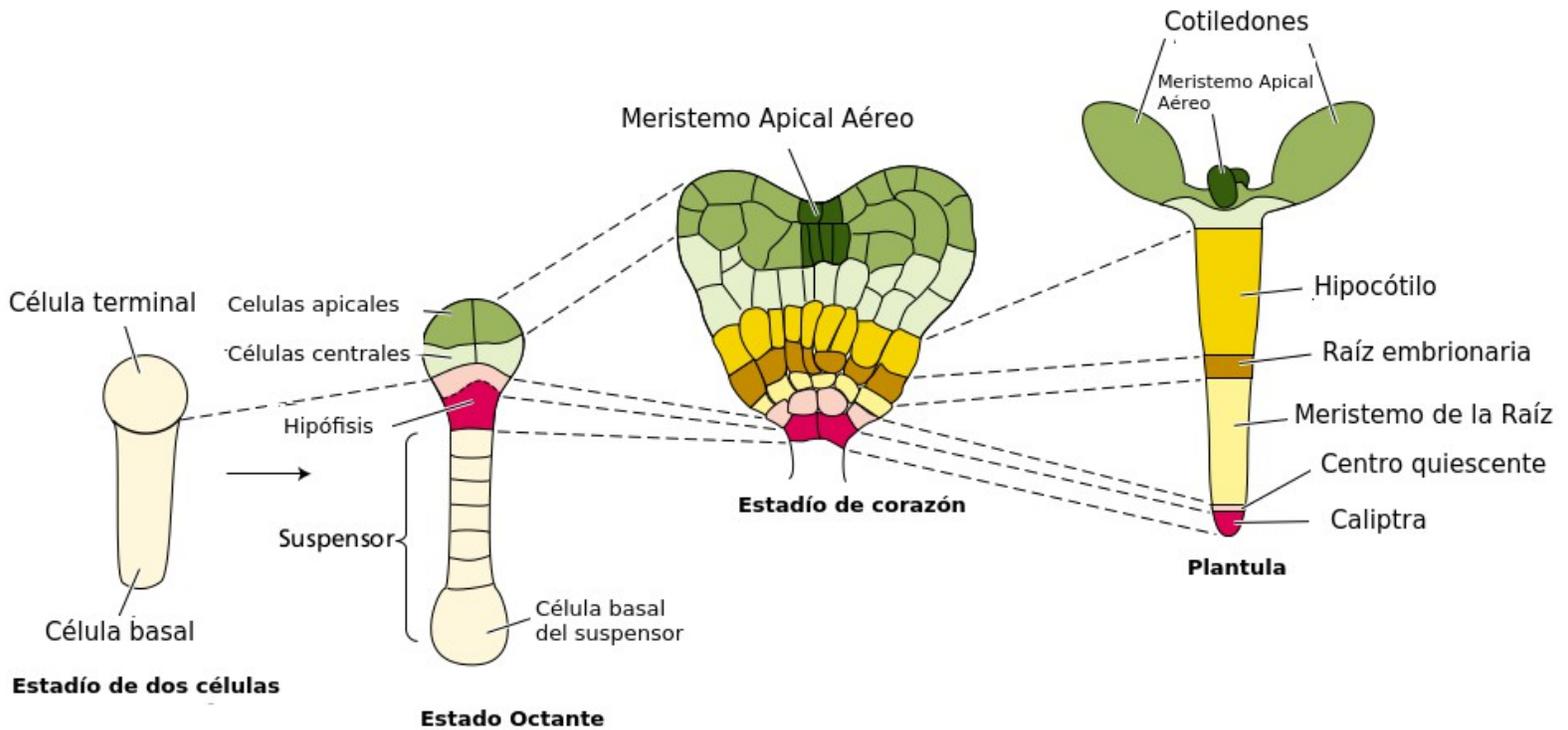


Figura 1. Representación de los estadios en el desarrollo del embrión, empezando por el estado de dos células, octante y estado de corazón. Del lado derecho se muestra una plántula en sus primeras etapas de desarrollo post-germinación. Los diferentes colores con las líneas punteadas nos indican en cada estadio, la identidad que mantienen las

células y la posición de los meristemos apicales (Modificada de Taiz y Zeiger, 2002).

En la embriogénesis surgen dos poblaciones de células meristemáticas que crecen en direcciones opuestas durante todo el ciclo de vida de la planta: el meristemo apical aéreo (SAM, por sus siglas en inglés: Shoot Apical Meristem) genera los órganos aéreos de la planta; mientras que el meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés: Root Apical Meristem) genera los órganos subterráneos (Cristel y Fletcher, 2003). El SAM produce hojas y ramas en la fase vegetativa y en la fase reproductiva, se convierte en un meristemo de inflorescencia a partir del cual se generan los meristemos de flor encargados de dar origen a los órganos florales (Benllocht, et al. 2007).

Se ha observado que el SAM de *Arabidopsis* tiene tres capas celulares, las dos capas más externas (L1 y L2) crecen como dos láminas bidimensionales de células con divisiones celulares orientadas de manera paralela a la superficie del meristemo y la tercera capa más interna (L3) contiene células que se dividen en todas las orientaciones (Barton, 2010). Las células de la capa L1 formarán la epidermis de los brotes, hojas y flores; las células de la capa L2 forman la mayor parte de las hojas y las células germinales. Las células de la capa L3 contribuyen a formar el tejido vascular y sus células asociadas (Cristel y Fletcher,

2003; Barton, 2010). Yuxtapuesto a las tres capas de células del SAM, se detectan tres zonas: la zona central (ZC) que alberga a las células madre totipotenciales y se caracteriza por una lenta actividad mitótica (Laufs, et al. 1998). La zona periférica (ZP) tiene las células que proliferan y en la zona más distal a la ZC empiezan a diferenciarse (Groß-Hardt y Laux, 2003). De la ZC se generan los MF. Por último, la zona de corpus (C) tienen células que se diferenciarán e incorporarán en órganos laterales o tejido vascular del tallo. El meristemo floral tiene la misma organización en términos de dominios celulares que el SAM hasta que se diferencia en los órganos florales (Figura 2; Cristel y Fletcher, 2003).

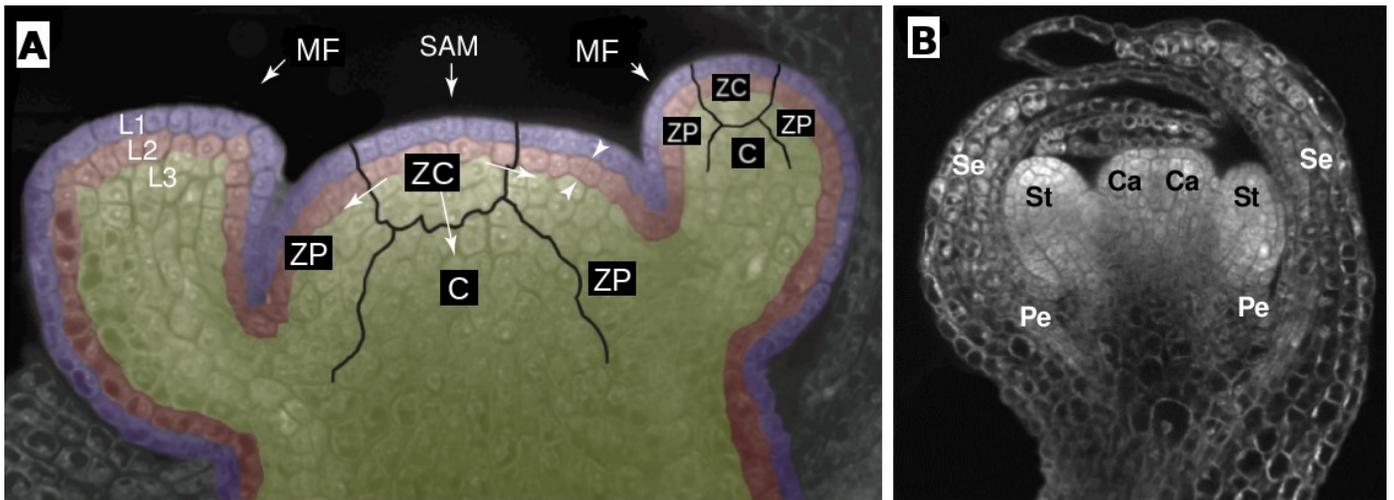


Figura 2. Micrografías confocales del SAM y del meristemo floral (MF). A) Se observa una inflorescencia de Arabidopsis con el SAM y los MFs adyacentes y en sus primeros estadios de desarrollo, los dominios coloreados (azul, rojo y amarillo) representan las capas celulares: en

Arabidopsis la túnica corresponde a dos capas, la epidermis L1 y la subepidermal L2, las dos puntas de flecha apuntan hacia las divisiones celulares anticlinales que ocurren en la L2, mientras que el corpus (L3) las divisiones son en todas direcciones. Las líneas negras representan los límites aproximados entre las diferentes zonas meristemáticas, zona central (ZC), zona periférica (ZP) y corpus (C). B) Se presenta un MF con mayor grado de desarrollo, en donde se observan los primordios de los diferentes verticilos florales: sépalos (Se), pétalos (Pe), estambres (St) y carpelos (Ca). (Modificada de Cristel y Fletcher, 2003).

Todos los procesos de proliferación y diferenciación celular que ocurren en el meristemo están regulados por redes moleculares que se expresan en zonas específicas del meristemo para mantener cierta actividad o identidad celular (Yadav, et al. 2009; Barton, 2010). Por medio de análisis genéticos y de biología molecular en individuos mutantes que mostraban diferentes tamaños y alteraciones en la organización del SAM, se descubrieron genes que participan directamente en la identidad o el mantenimiento de éstos, ya sea controlando mecanismos de proliferación celular, de dominios celulares y/o de diferenciación celular. Uno de los primeros genes que se detectó que participa en la formación del SAM de Arabidopsis fue *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, cuyos individuos mutantes generan embriones maduros que carecen de SAM

porque son incapaces de mantener la proliferación y la indiferenciación de las células de la ZP (Barton y Poethig, 1994).

Otro gen muy importante que se encarga de mantener las funciones de autorenovación y regulación de la integridad de la ZC del SAM y del meristemo floral es *WUSCHEL* (*WUS*). En embriones de plantas con *WUS* mutado, presentan un SAM en el que la ZC se agota (Laux, et al. 1996). En cambio, individuos mutantes en otros genes identificados que participan en la formación del SAM como son: *CLAVATA1* (*CLV1*), *CLV2*, *CLV3* y *CORYNE* (*CRN*), tienen un claro defecto en la transición de las células fuera de la ZC, lo que genera su expansión. El gen *CLV3* codifica un pequeño péptido específico de las células madre, el cual es el ligando de los complejos receptores kinasas *CLV1-CLV1* o *CLV2-CRN* (Brand, et al. 2000; Kondo, et al. 2006; Dodsworth, 2009). *CLV1*, *CLV2*, *CLV3* y *CRN*, actúan en la misma vía para limitar la expansión de la población de células madre indiferenciadas en el SAM y los meristemos florales (Clark, et al. 1993; Cristel y Fletcher, 2003). La señal de *WUS* da la identidad de las células madre en los meristemos y activa la expresión de *CLV3*. La señal del péptido *CLV3* activa la transducción de señales en cascada para restringir la expresión de *WUS*. Un incremento en los niveles de expresión de *CLV3* puede reprimir rápidamente la expresión de *WUS*, de este modo, el nicho de células troncales se mantiene delimitado a lo largo del ciclo de vida de las plantas (Figura 3; Müller, et al. 2006).

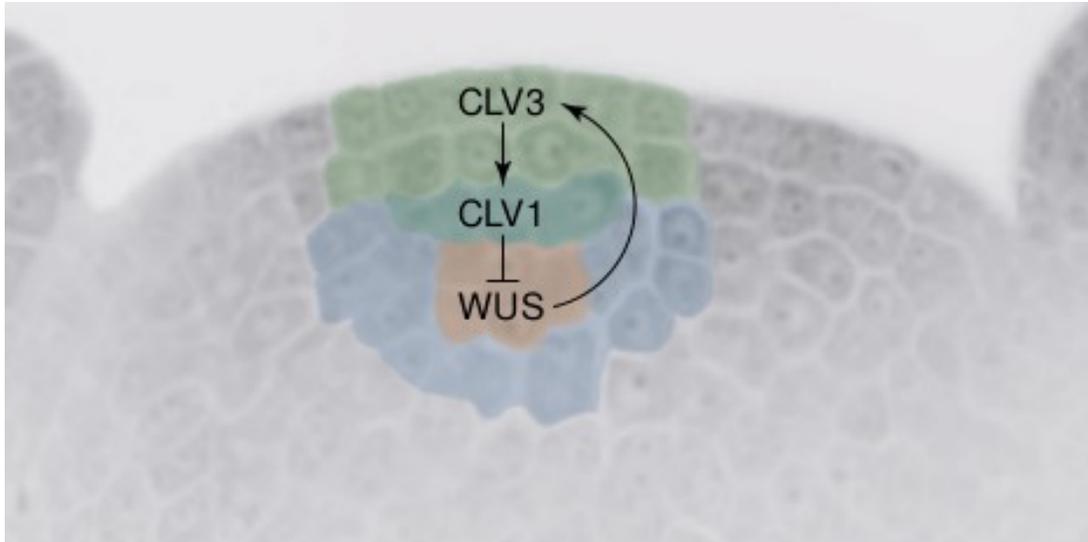


Figura 3. Regulación de las células madre en el SAM por medio de la señalización CLAVATA-WUSCHEL. La expresión del ligando *CLV3* se restringe a las capas L1 y L2 de la zona central (en verde), mientras que el ARNm de *CLV1* se detecta en la L3 de la ZC (azul y verde oscuro). El bucle de realimentación consiste en que *WUS* se necesita para una correcta formación del centro organizador (en café) y que especifica la identidad de células madre, este induce a su represor *CLV3*. *CLV3* al unirse a *CLV1*, reprime la expresión de *WUS* limitando así el tamaño del centro organizador (Tomada de Cristel y Fletcher, 2003).

1.1.1 GENES DE IDENTIDAD DE LOS MERISTEMOS DE INFLORESCENCIA Y DE FLOR.

El meristemo vegetativo produce hojas y tallos, cuando se dan las condiciones externas e internas propicias, el meristemo vegetativo se transforma en el meristemo de inflorescencia (MI) y este a su vez da lugar al meristemo de flor (MF). La dualidad entre MI y el MF se mantiene en el SAM hasta la senescencia gracias a genes que le dan la identidad a cada uno de ellos y que se reprimen mutuamente. Los genes *LEAFY (LFY)*, *APETALA1 (AP1)* y *CAULIFLOWER (CAL)* le dan la identidad al MF, mientras que *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* le da la identidad al MI (Benlloch, et al. 2007). *LFY* codifica para un factor transcripcional que sólo ha sido encontrado en el reino Plantae y se expresa a todo lo largo del desarrollo del MF. Individuos mutantes de pérdida de función de *LFY* generan inflorescencias en lugar de flores y un fenotipo similar ocurre en el mutante *ap1* (Weigel, et al. 1992; Maizel, et al. 2005). *AP1* codifica para un factor transcripcional que pertenece a una gran familia de factores transcripcionales con dominio MADS (el cual hace referencia a los nombres de los primeros genes que se encontraron con este dominio; MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS y SRF). Las líneas de plantas que tienen este gen mutado, presentan además de mayor número de inflorescencias defectos homeóticos en los verticilos florales 1 y 2. Al igual que *LFY*, *AP1* se transcribe de manera uniforme en primordios jóvenes de flores (Irish y Sussex, 1990; Mandel, et al. 1992). Por otro lado *CAL* que es un gen homólogo a *AP1* presenta un patrón de

expresión similar al último y su función también es redundante con *AP1* en la especificación de la identidad del MF (Benlloch, et al. 2007). Plantas mutantes *cal* tienen un fenotipo igual que las plantas silvestres; sin embargo, la pérdida de función de *AP1* y *CAL* genera una completa transformación de meristemas florales a meristemas de inflorescencias (Mandel y Yanofsky, 1995; Yanofsky, et al. 1999).

La función de *TFL1* contrasta con la de *LFY* y *AP1*, ya que en mutantes *tfl1* el meristemo de inflorescencia es sustituido por una flor terminal, además de presentar floración temprana, indicándonos que el papel de este gen es de represor de la floración (Shannon y Meeks-Wagner, 1991). *TFL1* está fuertemente expresado en el centro de los meristemas de inflorescencia. Por lo anteriormente dicho, *TFL1* tiene patrones de expresión complementarios a *LFY*, *AP1* y *CAL* debido a que *LFY* y *AP1* reprimen la expresión de *TFL1* en el meristemo de flor y visceversa, *TFL1* reprime la expresión de *LFY* y *AP1* en el MI; aunque no es claro si actúan como represores directos (Figura 4; Yanofsky, et al. 1999; Benlloch, et al. 2007).

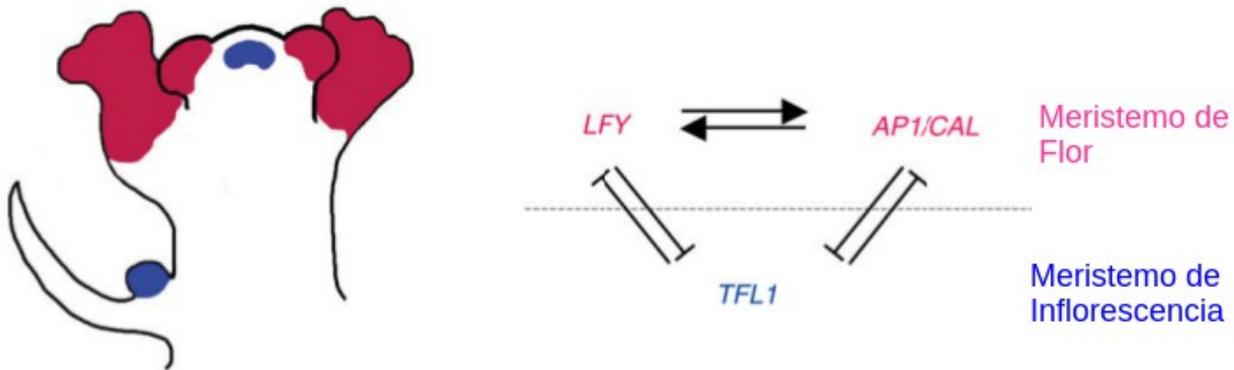


Figura 4. Regulación negativa entre los genes de identidad del MF *LFY/AP1/CAL* (rojo) y *TFL1* (azul) que el da la identidad al MI, las flechas indican regulaciones positivas mientras que las líneas chatas representan regulaciones negativas (Tomada de Benlloch, et al. 2007).

1.2 TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN.

Como mencioné anteriormente, la transición a la floración se refiere al paso del la fase vegetativa a la reproductiva. A nivel molecular se refiere a la activación de *LFY* en un cúmulo de células en la periferia del MI que se le llama “anlagen”. La red de regulación genética que lleva a la expresión de *LFY* responde a señales externas e internas de las plantas (Wils y Kaufmann, 2016). Mediante la caracterización de mutantes afectados en el tiempo de floración, bajo diferentes condiciones de crecimiento, se han descrito siete “vías” de respuesta a señales externas e internas que las plantas perciben para poder transitar a la floración: El fotoperiodo, la vernalización, señalización por giberelinas, la vía

autónoma, señalización por temperatura elevada, el desarrollo y la vía de la trehalosa (Fornara, et al. 2010; Pin y Nilsson, 2012; Matsoukas et al. 2012; Kumar et al. 2012; Wahl et al. 2013). Por la forma en la que se han descubierto estas vías, se les ha considerado ser independientes. Sin embargo, en condiciones naturales una planta está expuesta simultáneamente a muchas variables, tales como la duración del día y la temperatura, además de depender de su estado de desarrollo y metabolismo en conjunto. Esto permite a cada especie de angiospermas transitar a la floración cuando las condiciones son las más óptimas, por lo que más que “vías” independientes se trata de una gran red genética de regulación. Para fines de este trabajo, a continuación se describirá la señalización de dos de estas “vías”: la respuesta a fotoperiodo de día largo y a la temperatura elevada.

1.2.1 SEÑALIZACIÓN POR EL FOTOPERIODO DE DÍA LARGO.

Una variable ambiental que es una clara señal para que se dé la transición a la floración en plantas como *Arabidopsis* (que viven en latitudes alejadas del ecuador), es el fotoperiodo de día largo. La duración de luz / oscuridad en un ciclo diario de 24 horas va a depender de la latitud del planeta. Entre más cerca al ecuador, los días son intermedios con 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad, mientras que cercano a los polos estos ciclos se van modificando haciendo que los días sean más largos o más cortos según la época del año. Hay plantas que florecen en días largos, intermedios o cortos (Jackson. 2008; Hoong-

Yeet, et al. 2013). En *Arabidopsis* la floración se favorece en días largos (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad) simulando la primavera y el verano y se retrasada en días cortos (8 horas de luz / 16 horas de oscuridad) como en otoño e invierno de países de Euroasia, E. U. y Canadá.

A partir del análisis genético molecular de mutantes que presentaban floración tardía en día largo, se han encontrado los genes y el mecanismo molecular por el cual las plantas pueden detectar las horas de luz del día (Fowler, et al. 1999). Los genes que participan en la transición a la floración en respuesta al fotoperiodo de día largo, se expresan de manera circadiana en un periodo de 24 horas y están ligados a las señales de luz que son percibidas por los fotorreceptores de longitud de onda rojo y rojo-lejano llamados fitocromos (PhyA y PhyB) y los fotorreceptores de luz azul llamados cryptocromos (Cry1 y Cry2) (Imaizumi y Kay, 2006). La prevalencia de cierta longitud de onda cambia a lo largo del día teniendo principalmente luz roja en el rango rojo (650-680nm) - rojo lejano (710-740nm) en las primeras horas y luz azul (400-500 nm) en la tarde cuando se empieza a meter el sol. Los fotorreceptores son los responsables de detectar estos cambios de longitud de onda de manera periódica. Los cambios en las longitudes de onda a lo largo del día van a ser el marcapasos de los genes que forman parte del ciclo circadiano, en *Arabidopsis* el núcleo de la oscilación

circadiana consiste de un bucle de retroalimentación negativa con factores que se expresan por la mañana como las proteínas CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) y LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) y con factores que no requieren de la luz y se expresan en la noche como las proteínas TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1), EARLY FLOWERING 4 (ELF4) y LUX ARRHYTHMO (LUX) (Imaizumi y Kay, 2006).

En un tamizado de mutantes con fenotipo de floración tardía con respecto a las plantas silvestres al crecerlas en días largos, se encontró a *CO*. El mecanismo molecular de detección del fotoperiodo recae sobre esta proteína, para lo cual se requiere de su estricta regulación a nivel transcripcional y post-traducciona. En la regulación transcripcional intervienen varios factores que oscilan de manera circadiana causando las oscilaciones rítmicas en la expresión de *CO* (Yanovsky y Kay, 2002; Morris, et al. 2010). CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1) actúa como un represor directo de la expresión de *CO* y plantas con elevados niveles de CDF1 son de floración tardía a causa de los niveles de expresión reducidos de *CO* (Imaizumi, et al. 2005). Por otro lado se ha demostrado que las proteínas FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1) y GIGANTEA (GI) forman un complejo de manera dependiente de la luz azul, que se encarga de ubiquitinar a los CDFs para su degradación, y de este modo al ya no tener su represor directo, el transcrito de *CO* empieza a acumularse en la tarde (Sawa, et al. 2007). La regulación

post-traduccionale consiste en la estabilidad de la proteina de CO en dia largo. Se ha observado que la luz azul estabiliza la proteina nuclear en la tarde, en parte porque PHYA y CRY1/2 la protegen de su degradacion al inhibir la accion de CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1) y SUPRESSOR OF PHYA-105s (SPAs) que en conjunto ubiquitan a CO (Valverde, et al. 2004; Imaizumi, et al. 2005). COP1 actua de noche, por lo que en dia corto, la activacion anticipada de COP1/SPAs no permite la acumulacion de CO (Figura 5; Jang, et al. 2008; Imaizumi, et al. 2013).

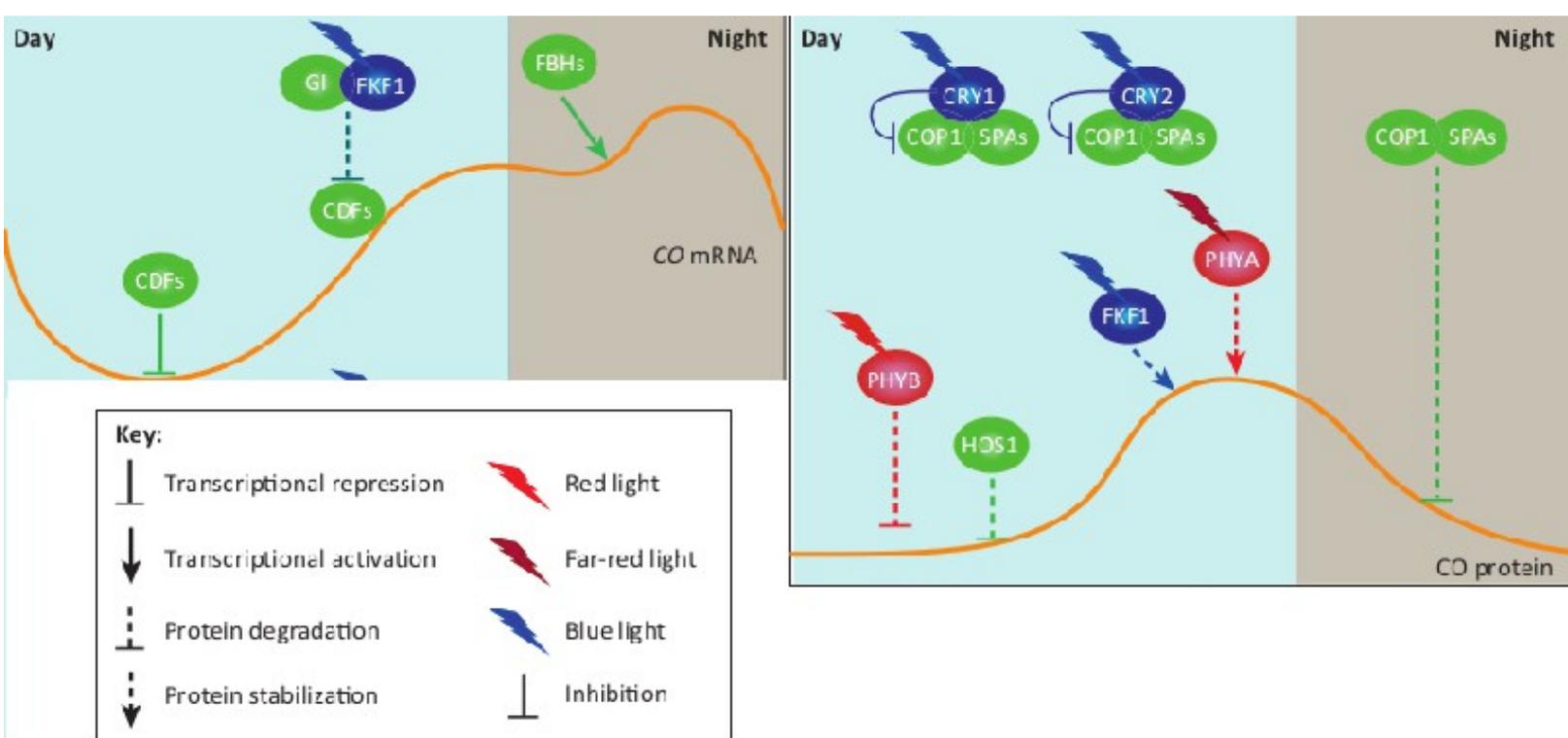


Figura 5. Esquema de la regulaci3n transcripcional y post-traduccionale de CO. En la regulaci3n transcripcional (lado izquierdo), las diferentes longitudes de onda de luz percibidas por los fotorreceptores a lo largo del d1a van a hacer que el ARNm de CO se acumule por la tarde gracias

a la formación del complejo FKF1-GI que es dependiente de luz azul y ubiquitina a los represores de CO, CDFs. En la regulación post-traducciona de CO (lado derecho), PHYA y CRY protegen de la degradación a CO inhibiendo su ubiquitinación dada por el complejo COP1-SPAs, el cual funciona de noche. En la mañana HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1 (*HOS1*) y el PHYB gracias a la luz roja absorbida, se encargan de mediar la degradación de la proteína CO (modificada de Imaizumi, et al. 2013).

CO tiene un dominio CCT el cual se ha relacionado a procesos como floración, señalización por luz y regulación de los ritmos circadianos. Se sabe que este dominio interactúa con subunidades de las proteínas HAP3 y HAP5 para formar un complejo que induce la expresión de *FLOWERING LOCUS T (FT)*, un gen fundamental en la transición a la floración (Wenkel, et al. 2006). *FT* codifica para una proteína de unión a fosfatidil-etanol-amina similar a las proteínas inhibidoras de Raf cinasas en animales (Teper-Bamnolker y Samach, 2005). Evolutivamente, el locus *FT* ha jugado un papel central en la diversificación y adaptación de plantas a diferentes latitudes (Pin y Nilsson 2012).

Durante décadas se sabía de la existencia del florigeno, una “sustancia” que se transportaba desde las hojas al meristemo apical. Actualmente sabemos que esa “sustancia” corresponde a la proteína FT (Corbesier, et al. 2007). *FT* se transcribe y traduce en la hojas y la proteína es transportada por el floema hasta el SAM donde forma un complejo con el factor transcripcional bZIP FD. FT-FD activan la expresión de *SUPPRESSOR OF CONSTANS1 (SOC1)* y *API* promoviendo así la transición a la floración (Figura 6; Corbesier y Coupland, 2006; Kobayashi y Weigel, 2007; Pin y Nilsson, 2012).

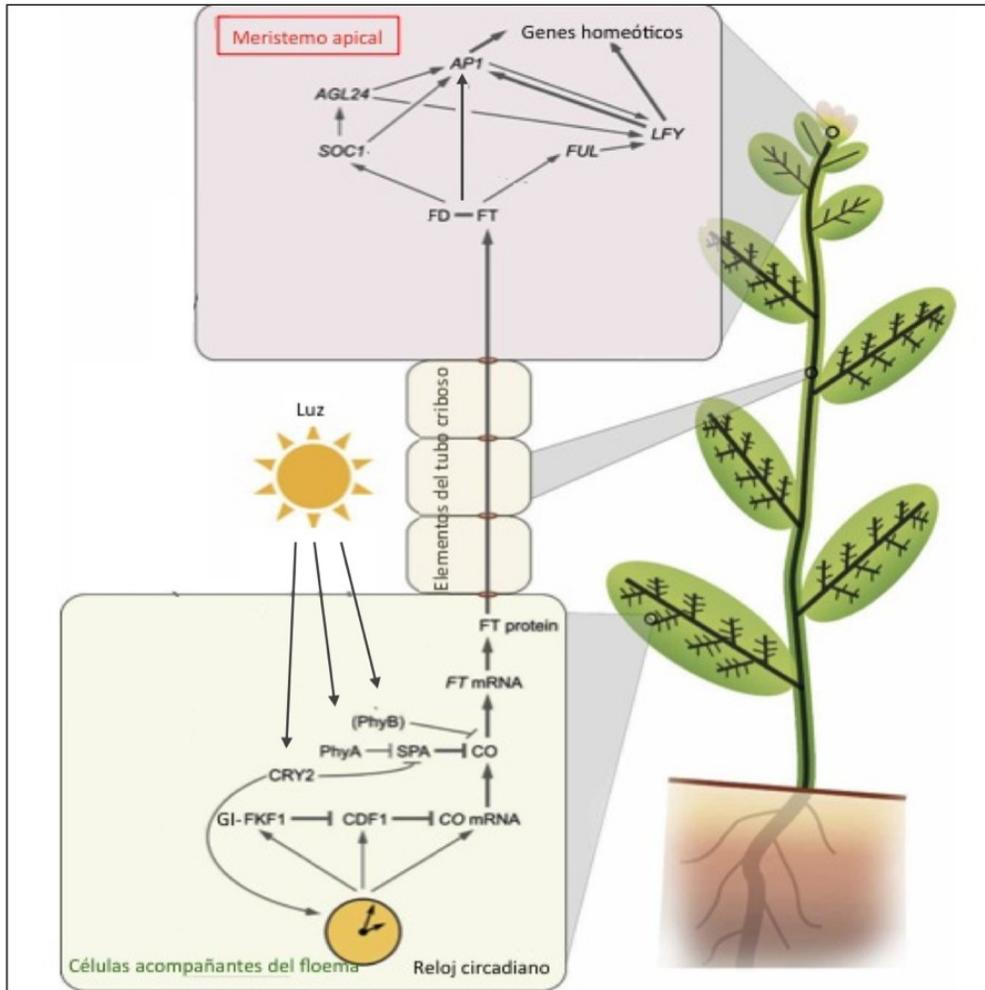


Figura 6. Las diferentes longitudes de onda luz a lo largo del día van a ser detectadas por los fotorreceptores (PhyA, PhyB y CRY), los cuales se van a relacionar con genes del ciclo circadiano, algunos de estos son los responsables de detectar el fotoperiodo de día largo (GI, FKF1, CDF1 y CO). Todo el mecanismo va recaer en la regulación de CO que va a ser fundamental para la transcripción de *FT*, el cual se traduce en las hojas y la proteína viaja a través del floema hasta el SAM donde forma un complejo con el factor transcripcional FD que se encarga de activar a

SOC1 y *API* e indirectamente a *LFY* desencadenando la formación de los meristemas florales (tomada de Kobayashi y Weigel, 2007).

1.2.2 TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN EN RESPUESTA A LA ALTA TEMPERATURA.

El aumento de la temperatura está muy relacionado con el fotoperiodo de día largo. En latitudes en donde se distribuye naturalmente *Arabidopsis*, los días largos de primavera y verano aumenta la temperatura, por lo que los mecanismos moleculares para detectar estas variables deben de guardar una relación. En la última década se han descubierto genes que desencadenan mecanismos dependientes de la temperatura y están relacionados con la señalización del fotoperiodo de día largo (Song, et al. 2013).

Para poder establecer el efecto de la temperatura en la transición a la floración, se eliminó la señalización del fotoperiodo de día largo creciendo las plantas en día corto con una temperatura elevada de 27°C, considerando que la temperatura óptima para crecer *Arabidopsis* es 22°C. Esta condición resultó ser igual de eficiente en la inducción de la floración en *Arabidopsis* que cuando se pasan las plantas de día corto a día largo, dando como resultado una floración temprana. Esto fue la prueba de que la temperatura también afecta el tiempo de floración y que las plantas deben de tener un mecanismo para percibir cambios en la temperatura ambiental (Balasubramanian, et al. 2006).

Se conocía que los factores transcripcionales tipo bHLH, PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs) modulan el crecimiento de las plantas en respuesta a la alta temperatura (Prat y Lucas, 2014). *PIF4* en particular aumenta su expresión a 27°C y se ha demostrado su participación en la red de regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*. El mutante *pif4* muestra un fenotipo de floración tardía cuando las plantas son crecidas a 27°C (Koini, et al. 2009; Kumar, et al. 2012).

Adicionalmente se demostró, que PIF4 se une directamente al promotor de *FT* de forma dependiente de la temperatura gracias al decremento del nucleosoma H2A.Z. Es decir conforme aumenta la temperatura, el nucleosoma que se encuentra en o alrededor de las regiones reguladoras de *FT*, se hace laxo permitiéndole a PIF4 unirse al promotor de este gen (Kumar, et al. 2012). De este modo se demostró que *FT* induce la floración a 27°C al ser activado por PIF4 (figura 7; Kumar, et al. 2012)

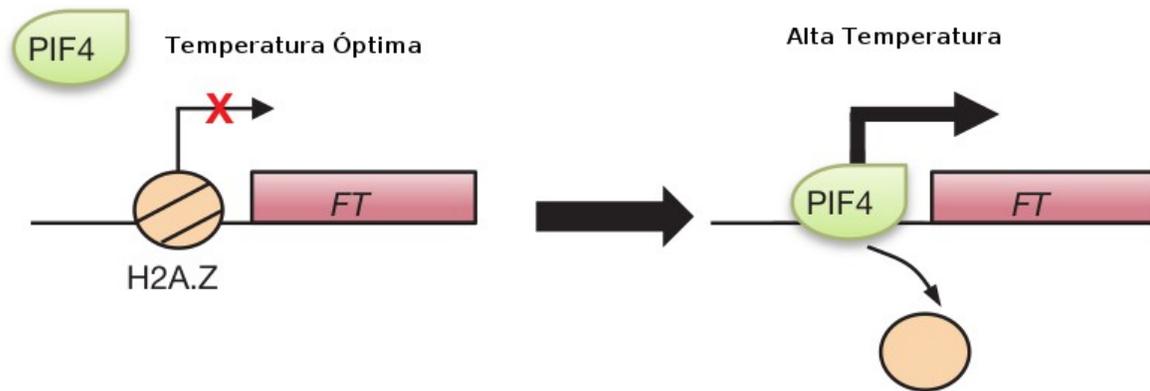


Figura 7. Esquema de la activación de *FT*, por la unión de la proteína PIF4 a su promotor en respuesta a la alta temperatura. Conforme aumenta la temperatura el nucleosoma H2A.Z se hace más laxo permitiéndole a PIF4 la unión al promotor de *FT* (modificada de Kumar, et al. 2012).

Posteriormente se demostró que PIF5 al igual que PIF4 participa en la regulación de la floración por temperaturas cálidas independientemente de la regulación por CO y que ambos *PIFs* presentan una regulación transcripcional circadiana (Nozue, et al. 2007; Thines, et al. 2014).

1.3 LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES MADS-BOX EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS.

Los factores transcripcionales con dominio MADS constituyen una de las familias de genes cruciales en el desarrollo de los eucariontes, incluidas las plantas. Originalmente se vio su importancia en la especificación de los órganos florales. De hecho *AGAMOUS* (*AG*), un gen homeótico que especifica estambres y carpelos, fue uno de los primeros genes MADS-box estudiados (Yanofsky, et al. 1990). Más recientemente se ha

observado que los MADS-box participan en el desarrollo de las plantas durante todo su ciclo de vida (Smaczniak, et al. 2012).

La familia de factores transcripcionales MADS-box se puede dividir en dos linajes (I y II) con base en los dominios estructurales de la proteína. Los genes de la familia MADS-box tipo I son aquellos que tienen solamente el dominio MADS de unión al DNA de 60 aminoácidos y un carboxilo terminal y los del tipo II tiene una estructura modular llamada estructura MIKC ya que contiene un N-terminal localizado en el dominio MADS, seguido de una región I (intermedia) y una región K (parecida a keratina), las cuales son esenciales para la dimerización y formación de complejos con otras proteínas. El carboxilo terminal ayuda en la formación de complejos protéicos y en la trans-activación (Alvarez-Buylla, et al. 2011; Smaczniak, et al. 2012). Los genes MADS-box tipo II participan en la embriogénesis, la floración y el desarrollo de la raíz, la flor y el fruto (Figura 8; De Bodt, et al. 2003; Smaczniak, et al. 2012).

Algunos MADS-box tales como *XAANTAL 1 (XAL1)*, *XAL2*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19)*, *AGL17* y *AGL24* entre otros, son importantes activadores de la transición a la floración (Lee et al., 2000; Michaels, et al. 2003; Schönrock, et al. 2006; Perez-Ruiz, et al. 2015). Mientras que algunos otros como *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*

y *AGL18* tienen un papel como represores de ésta (Hartmann, et al. 2000; Ratcliffe, et al. 2001; Adamczyk. et al. 2007).

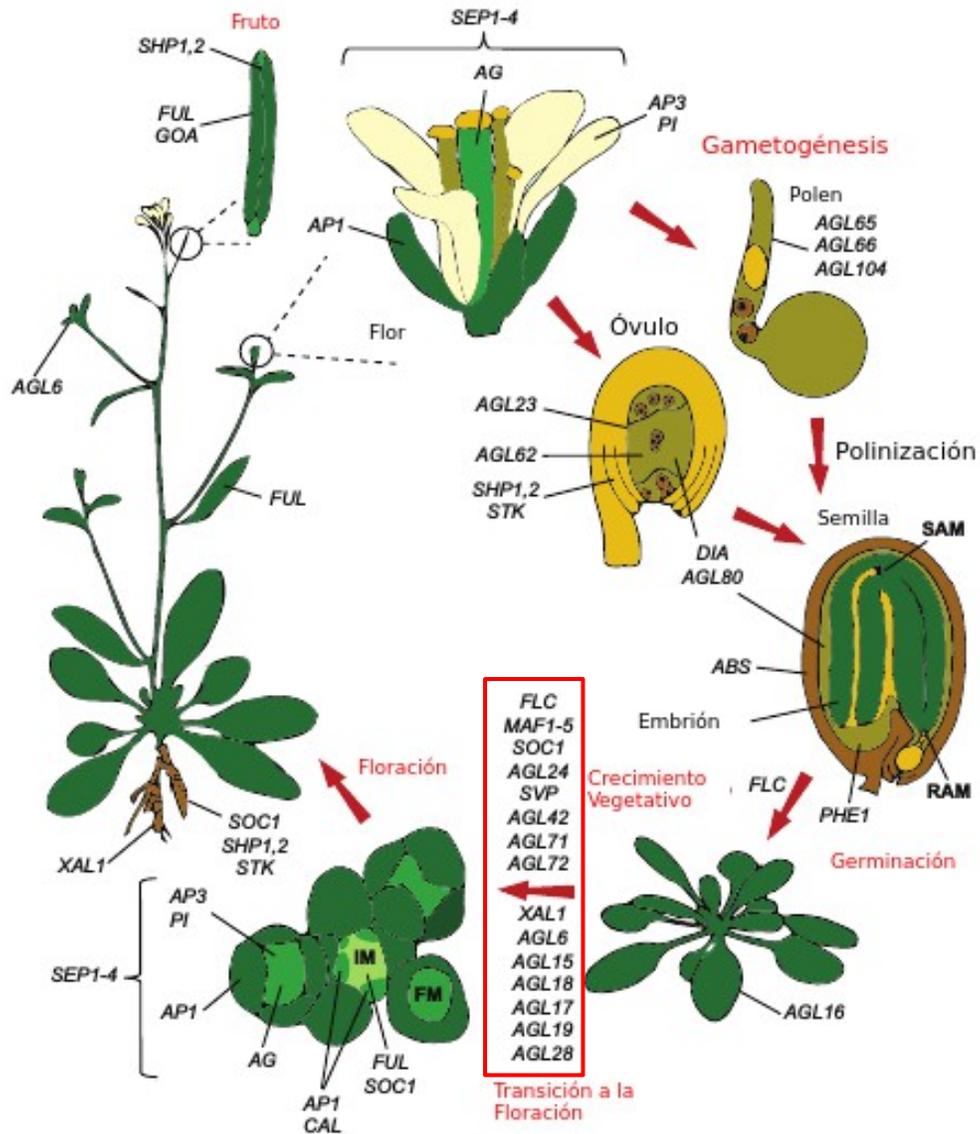


Figura 8. Participación de los genes MADS-box en cada etapa de desarrollo durante todo el ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*. Nótese que un importante número de genes de este tipo participan en la floración (recuadro). (Modificada de Smaczniak, et al. 2012).

2. ANTECEDENTES.

2.1 *XAL1* EN LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN.

Los alelos mutantes de *XAL1* presentan un fenotipo de raíz corta y floración tardía en día largo y por esto se le dio el nombre de xaantal “que toma más tiempo” en maya. *XAL1* es un gen hermano de *AG* (según ciertas filogenias), sin embargo, *XAL1* se expresa principalmente en la raíz (Yanovsky, et al. 1990; Tapia-Lopez, et al. 2008).

En el 2008 se demostró que individuos mutantes *xal1* tienen un meristemo de raíz más corto, siendo este gen un componente importante de los mecanismos moleculares que controlan la proliferación en la raíz, convirtiéndose en el primer MADS-box que participa en la regulación de la duración del ciclo celular en plantas (Tapia-Lopez, et al. 2008). En este estudio también se demostró que *xal1* presenta un fenotipo de floración tardía en la condición de fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad), indicando que este gen participa en la transición a la floración en la red molecular encargada de detectar el fotoperiodo de día largo (Figura 9). Así mismo se observó que se expresa principalmente en el tejido vascular de forma similar a lo reportado para *CO* y *FT* (Tapia-Lopez, et al. 2008).

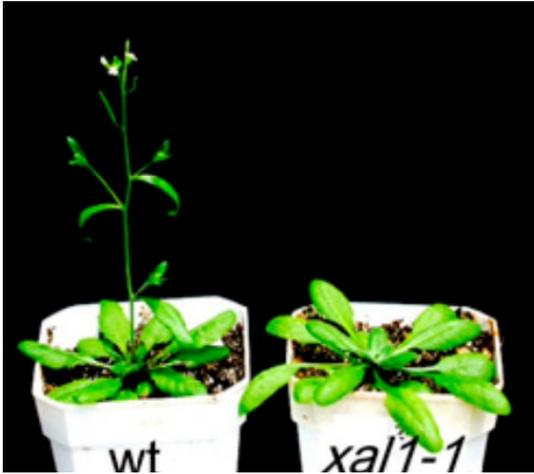


Figura 9. Fenotipo de floración tardía en mutante *xal1-2* comparado con una planta silvestre a los 32 días de edad (tomada de Tapia-Lopez, et al. 2008).

Mediante el análisis de expresión se encontró que *XAL1* regula positivamente a tres “promotores florales” *FT*, *SOC* y *LFY*; por otra parte también se demostró que *CO* regula parcialmente la expresión de *XAL1*. Por lo anterior nos parece factible pensar que *XAL1* está por debajo de *CO* y por arriba de *FT* en la red de regulación en respuesta al fotoperiodo de día largo (Figura 10; Tapia-Lopez, et al. 2008).

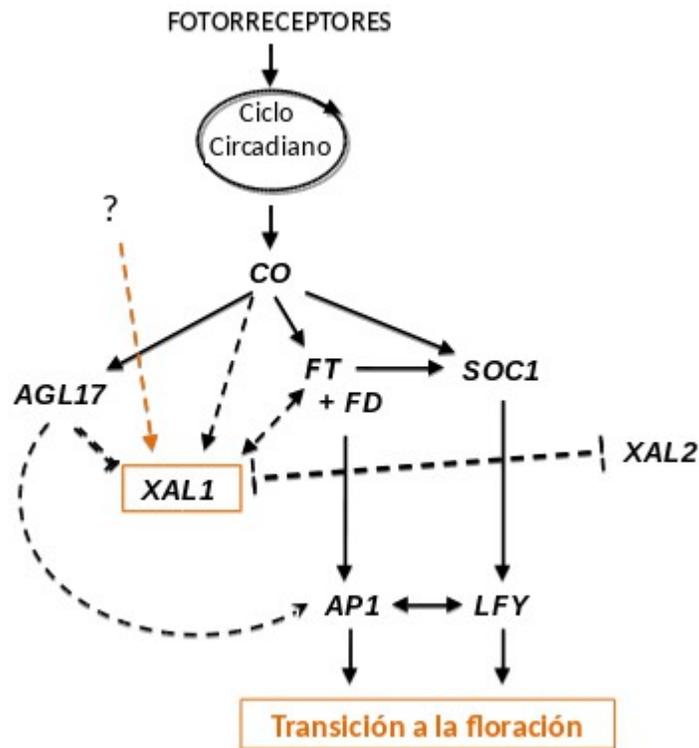


Figura 10. Red de regulación en la que *XAL1* interacciona con otros genes en la transición a la floración en la respuesta al fotoperiodo de día largo. Las flechas indican regulaciones positivas mientras que las líneas chatas representan regulaciones negativas. Las líneas entrecortadas indican regulaciones obtenidas en el laboratorio y las continuas las reportadas en la literatura (modificada de Domínguez-Román, 2012).

En estudios más recientes del laboratorio se describieron otras relaciones genéticas de *XAL1* en la respuesta al fotoperiodo. Se probó que *AGL17* y *XAL2* son reguladores negativos de *XAL1* y que con el segundo mantiene una retroalimentación negativa (Domínguez-Román, 2012). También se demostró que *XAL1* es necesario, pero no suficiente para inducir la floración ya que en líneas de sobreexpresión de *XAL1* no se induce la floración en comparación con las plantas

silvestres, lo cual se puede deber a que XAL1 necesite formar complejos con otras proteínas entre las que podrían estar: SOC, AGL21, AGL16, AGL74-N y SEP1 (Theissen, 2001; De Folter, et al. 2005; Domínguez-Román, 2012).

Por otra parte, al saber que CO es un regulador positivo de XAL1 se generó un doble mutante *co xal1* con el fin de entender mejor esta relación genética. Los dobles mutantes mostraron un fenotipo de floración tardía sumatorio con respecto al de los mutantes sencillos (Figura 11; Domínguez-Román, 2012), lo cual podría deberse a que CO y XAL1 regulan de forma independiente a blancos comunes o bien son parcialmente independientes.

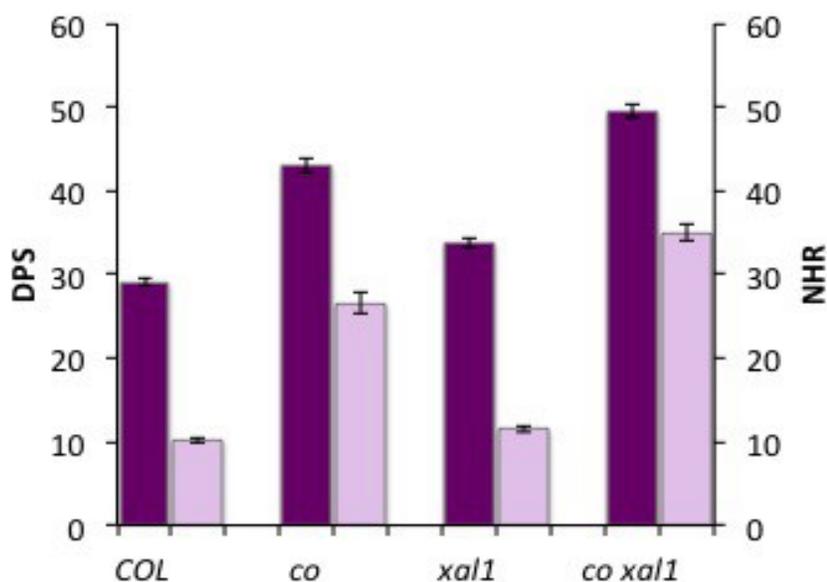


Figura 11. Análisis del tiempo de floración de la doble mutante *co xal1* comparada con sus parentales y plantas silvestres. Se puede observar el efecto sumatorio en el retraso de la floración del doble mutante comparado con sus parentales. Los días post-siembra (DPS) se representan por las barras de color morado y el

número de hojas de roseta (NHR) se representa con las barras de color lila estos parámetros se utilizan para cuantificar el tiempo de floración (tomada de Domínguez-Román, 2012).

En el presente trabajo, nos propusimos conocer si los genes que son regulados positivamente por CO en respuesta al fotoperiodo de día largo como son: *FT*, *SOC1*, *API* y *LFY* podrían ser blancos comunes con XAL1, lo que permitiría explicar el fenotipo sumatorio del doble mutante. Por otra parte, ya que *FT* es regulado por PIF4 en respuesta a la temperatura elevada (Kumar, et al. 2012) independientemente de CO, en este trabajo nos preguntamos si XAL1 podría estar regulando a *FT* en esta condición.

3.JUSTIFICACIÓN.

La transición a la floración es un proceso de desarrollo de las plantas angiospermas que es vital para que estas puedan completar su ciclo de vida. El momento en que las plantas transitan del estado vegetativo al reproductivo está en íntima relación con las señales internas del desarrollo de las plantas, el ambiente (temperatura, fotoperiodo, irrigación etc.) y la interacción con polinizadores. Por lo tanto, el análisis de la red genética que regula esta transición es de suma importancia y se refleja en diferentes ámbitos que incluyen: el ecológico-evolutivo (plasticidad y diversificación de las angiospermas a diferentes ámbitos) y la domesticación de diferentes cultivos de importancia para los humanos, en el que se ha modificado el patrón de floración de algunas variedades de plantas.

Los genes MADS-box participan en diferentes procesos de desarrollo en todos los eucariontes aunque todos se pueden asociar con procesos de proliferación y diferenciación celular. Una pregunta fundamental en la biología del desarrollo es: cómo este tipo de factores transcripcionales se han reclutado para llevar a cabo diferentes procesos. XAL1 es uno de estos factores que se expresa preponderantemente en la raíz y sin embargo también es importante para la regulación de la floración (Tapia-López et al., 2008). Conocer la función de XAL1 aportará conocimiento sobre el cómo las plantas responden a diferentes señales que les permiten a las angiospermas transitar a la floración y además nos dará indicios de la participación de este gen en el desarrollo de diferentes órganos.

Además nos interesa conocer de qué forma las plantas pueden afrontar las condiciones que no son las óptimas para su desarrollo, las cuales podrían llegar a afectar el tiempo de floración. Por ejemplo, en las últimas décadas el cambio climático ha llevado a un aumento de la temperatura y cambios en la distribución del agua, por lo que resulta importante el estudio de la red genética de la transición a la floración en respuesta a la temperatura elevada. Una de las razones por la que llevó a cabo este proyecto. Los genes MADS-box participan en procesos de desarrollo tanto en animales plantas y hongos, se ha observado que muchos genes de esta familia, del linaje tipo II (con estructura MIKC) participan en la transición a la floración al igual que *XAL1* que también pertenece a este linaje. Su estudio y comprensión en el fenómeno de transición a la floración permite entender la capacidad de las plantas en la detección de señales externas e internas que le dan su capacidad de adaptación y diversificación ante cambios ambientales así como aplicaciones en el mejoramiento de plantas de importancia alimenticia.

4. HIPÓTESIS.

XAL1 actúa junto con CO como activadores de *FT* en el fotoperiodo de día largo e independientemente de CO en respuesta a la temperatura elevada.

5. OBJETIVO GENERAL.

Establecer el papel de *XAL1* en la red de regulación de la transición a la floración en respuesta a fotoperiodo de día largo y temperatura elevada.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Analizar de la expresión de *XAL1* en plantas silvestres a lo largo de las horas de luz durante día largo.
- Analizar de la expresión de genes que participan en respuesta fotoperiodo: *FT*, *SOC*, *LFY* y *API* en el doble mutante *co xal1*, comparado con los parentales y las plantas silvestres.
- Generar el doble mutante *ft xal1*.
- Determinar si GI es un regulador de *XAL1* en repuesta a fotoperiodo de día largo
- Determinar si *XAL1* participa en la floración en respuesta a la alta temperatura.
- Determinar si PIF4 regula a *XAL1* en respuesta a altas temperaturas

6. MÉTODOS.

6.1 LÍNEAS DE PLANTAS UTILIZADAS.

Para realizar este proyecto de investigación se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) tanto para las plantas silvestres (WT) como mutantes (Tabla I).

Tabla I. Líneas de plantas utilizadas

LÍNEA	REFERENCIA
1. <i>xal1-2</i>	Tapia-López, et al. 2008
2. <i>co-1</i>	Han et al. 2008
3. <i>co xal1</i>	Domínguez Román, 2012
4. <i>ft-10</i>	GabiKat - GK_290E08
6. <i>gi</i>	Salk_092757
7. <i>pif4-2</i>	Kumar, et al. 2012
8. Col (WT)	

6.2 CRECIMIENTO DE PLANTAS *IN VITRO*.

Las semillas se esterilizaron usando una solución de Cloro 60%, Tween 20 0.005%, durante 5 minutos en agitación, seguido de 5 lavados con agua bidestilada estéril y se estratificaron a 4°C durante dos días. Las plantas se crecieron en cajas petri con medio *Murashige and Skoog* (MS) al 0.2X con 1% de sacarosa y 1% de agar. Para los análisis de expresión de los genes que participan en el fotoperiodo de día largo, las plantas se crecieron en 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad de luz de 7000 luxes, a una temperatura de 22°C (temperatura óptima). En el caso del análisis de los genes que participan en respuesta a la alta temperatura, las semillas se sembraron igualmente en MS 0.2X pero ahora se crecieron en condiciones de día corto (8 horas de luz y 16 de oscuridad) a una

intensidad de luz de 15500 luxes y una temperatura de 27°C (temperatura elevada para *Arabidopsis*). A los 14 días de crecimiento se cortó con un bisturí la parte aérea de las plantas, se colocaron en tubos eppendorf previamente etiquetados y se congelaron en nitrógeno líquido.

6.3 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.

Partiendo de muestras de plantas previamente congeladas en nitrógeno líquido, se molió el material con un pistilo previamente esterilizado. Se agregaron 700 µl de buffer de extracción (Tris-HCL 0.2 M pH 7.5, NaCl 0.25 M, EDTA 0.025 M pH 8 y SDS 0.5%), se mezcló con el vortex y se dejó reposar 10 minutos. Se agregaron 700 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en el vortex y se dejó reposando otros 10 minutos. Una vez que las fases se habían separado se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se colocó en otro tubo. Se le agregó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol al 70%, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Al final se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 30 µl de H₂O miliQ con un 1 µl de ARNasa 10 mg/ml.

6.3.1 GENOTIPIFICACIÓN Y ELECTROFORESIS.

Se confirmó que todos los mutantes se encontraran en estado homocigoto utilizando los oligonucleótidos y condiciones de amplificación descritas en la Tabla II.

Tabla II. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación de ADN genómico.

Gen (Fragmento esperado)	Oligo-nucleótidos	Secuencia	Ciclo	Número de Ciclos
<i>XAANTAL1</i> gen (1kb)	NASC12RP NASC12LP	5' CTTCATTTCGAAACACAATGC3' 5' ACCCAAACGTCAAATCATCAG3'	94°C-30s 56°C-30s 72°C-1m	30X
<i>XAANTAL1</i> inserción (600pb)	GK-TDNA NASC12RP	5' CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC3' 5' CTTCATTTCGAAACACAATGC3'	94°C-30s 56°C-30s 72°C-30s	30x
<i>CONSTANS</i> (476 pb)	CO-GT1 CO-R KIM	5' CTGCAAACCCACTTGCTAGA3' 5' CCATTGTCGTTGTAGTGAGT3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	30X
<i>Gl</i> gen (1kb)	GI(T)F GI(T)R	5' CCCTCCGAATCATTGTGATGTCTTT3' 5' TGACTATTCGGAGCAATGGGC3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	30x
<i>gi</i> Inserción (500 pb)	Salk LBb1 GI(T)R	5' GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC3' 5' TGACTATTCGGAGCAATGGGC3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	30x
<i>FT</i> gen (500 pb)	FTGkatF FTGkatR	5' TGCATAAGTGATTATTATTTAGG3' 5' ATGGAGATATTCTCGGAGGTG3'	94°C-30s 58°C-30s 72°C-30s	30x
<i>ft-10</i> Inserción (400 pb)	LBGkat FTGkatR	5' ATATTGACCATCATACTCATTGC3' 5' ATGGAGATATTCTCGGAGGTG3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	30x
<i>PIF4</i> gen (912 pb)	PIF4-RD-F EMO207	5' AACCAACGATCAGGATCAAACCGAA3' 5' TCCAAACGAGAACCGTCGGT3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	30X
<i>PIF4</i> Inserción (400 pb)	Sail LB2 EMO207	5' GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA3' 5' TCCAAACGAGAACCGTCGGT3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	35X

Para poder ver las bandas de ADN amplificadas se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% y TBE 0.5X (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM pH8 y EtBr) a 100 volts. Las bandas se observaron en un trans-iluminador con luz UV. Las fotos a los geles se obtuvieron con un software especializado (Geldoc) que está adaptado al transiluminador. Todas las imágenes de geles se procesaron con un software (Photoshop) para cuantificar la densidad integrada que presentan cada una de las bandas. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores de las bandas control (*TUBULINA*), posteriormente se estandarizaron tomando como valor de 1 la densidad integrada de línea de las plantas silvestres.

6.4 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

Partiendo de muestras de material biológico congelado en nitrógeno líquido de 14 días de edad, se molió el material en un mortero con pistilo previamente esterilizados, agregando nitrógeno líquido a la muestra para que esta no se descongelara. Con el material aún congelado se agregó 1ml de TRIZOL (Invitrogen), se mezcló con el pistilo y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el material de los morteros a tubos eppendorf y se agregaron 200 µl de cloroformo, se mezclaron en el vortex cada 3 minutos durante 9 minutos. Después se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en otro tubo eppendorf y se agregó 500 µl de isopropanol por cada ml de TRIZOL. Se mezcló por inversión y se dejaron reposar 45 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado al precipitado agregando 500 µl de etanol al 70% y centrifugando a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado para finalmente resuspenderlo en 30 µl de H₂O miliQ. Las muestras se

cuantificaron en un nanodrop 2000 a 260 nm y todos los ARNs se diluyeron a la misma concentración de 1µg/µl.

Una vez cuantificadas las muestras, se analizaron por electroforesis para confirmar que se encontraban en la misma concentración. Se tomaron 2 µl de ARN 1µg/µl con 9.5 µl de buffer de muestra (MOPS 1.3 X, formaldehído 5.8% (v/v), EtBr 50 µg/µl, formamida 29.55 M, glicerol 0.5% (v/v)). Las muestras con el buffer de carga se desnaturalizaron a 65°C durante 10 minutos y se pasaron a hielo. Para la electroforesis se realizó un gel de agarosa al 1.2% con formaldehído al 3% (v/v) y 5ml de MOPS 10X (MOPS 20 mM, acetato de sodio 5 mM pH 5.2, EDTA 1 mM pH 8), las muestras se corrieron a 100 volts en MOPS 1X.

6.5 RT-PCR.

Para la síntesis de ADN complementario (cADN) se utilizó la enzima reverso-transcriptasa Superscript II. Se usaron 2 µg de ARN en presencia de 1 µl de dNTPs 0.5 mM, 1 µl de Oligo dT 10 µM y Agua miliQ a un volumen final de 11 µl. Se desnaturalizó a 65°C por 5 minutos y se transfirieron a hielo. Se les agregó 4 µl de First Strand Buffer 5X, 2 µl de DTT 1mM y 1 µl de la enzima Superscript II 200U. Los tubos se incubaron a 42°C durante 50 minutos, transcurrido el tiempo se inactivó la reacción pasando los tubos a 70°C durante 15 minutos y se guardaron a -20°C.

Para las reacciones de PCR se utilizó 2 µl del buffer 10X de la Taq-polimerasa, 0.6 µl de MgCl 1.5mM, 1 µl de oligonucleótidos 10 µM, 1.5 µl de dNTPs 0.2 mM y 0.2 µl de Taq polimerasa 1U. Para el control se utilizó la *TUBULINA* que se expresa

constitutivamente. En la Tabla III se muestran los oligonucleótidos y las condiciones utilizadas para las amplificaciones de PCR.

Tabla III Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación de ADNc

Gen Fragmento esperado	Oligo-nucleótidos	Secuencia	Tm	Ciclos
<i>Tubulina</i> 700pb	TubF TubR	5' -CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA- 3' 5' -TCACCTTCTTCATCCGCAGTT- 3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-1m	25X
<i>Gl</i> 740pb	GI(T)F GI(T)R	5' -TTTCCCGAATCATTGTGATGTCTTT- '3 5' -TGAATATTTCGGAGCAATGGGC- 3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	35X
<i>FT</i> 375pb	Ft5-3 Ft3-2	5' -CCTGCTACAACCTGGAACAACCTTT- 3' 5' GAACTACTATAGGCATCATCACCGTTTCG- 3'	94°C-30s 66°C-30s 72°C-30s	35X
<i>LFY</i> 513pb	LFY-F LFY-R	5' -TGAAGGACGAGGAGCTT-3' 5' -TTGCCACGTGCCACTTTC-3'	94°C-30s 52°C-30s 72°C-30s	30X
<i>AP1</i> 524pb	AP1-F AP1-R	5' -GCACCTGAGTCCGACGTC-3' 5' -CATGCGGCGAAGCAGCCAAGG-3'	94°C-30s 60°C-30s 72°C-30s	30X
<i>SOC1</i> 390pb	SOC-F SOC-R	5' -TGAGGCATACTAAGGATCGAGTCAG-3' 5' -AAGTTCTGAAGTAGAGACGC-3'	94°C-30s 58°C-30s 72°C-30s	28X
<i>XAL1</i> 350pb	RT-F RT-R	5' -TGGTCGTGGTTCTTCTTCTGCTAC-3' 5' -TGTCTCCATGACTGCGAAGTTAGC-3'	94°C-30s 68°C-30s 72°C-30s	30X
<i>PIF4</i> 554pb	PIF4 RD-F EM0207	5' -AACCAACGATCAGGATCAAACCGAA-3' 5' -TCCAAACGAGAACCGTCGGT-3'	94°C-30s 62°C-30s 72°C-30s	30X

6.6 EXPRESIÓN DE XAL1 A LO LARGO DE LAS HORAS DE LUZ.

Para este ensayo se usaron plantas silvestres de ecotipo Columbia las cuales a los 14 días de crecimiento *in vitro* se colectó toda las plantas cuando la cámara de crecimiento aún estaba apagada (15 min antes de encenderse la luz = 0 hrs) y cada tres horas de luz (3hr, 6hr y 9hrs) para su extracción de ARN.

6.7 TIEMPO DE FLORACIÓN DE LAS PLANTAS SILVESTRES Y MUTANTES A 27 °C.

Las semillas se estratificaron en agua 2 días a 4°C, se sembraron en macetas con suelo comercial (SunGRO Metro-mix 200) y se crecieron a una cámara controlada (CONVIRON) a 27°C con fotoperiodo de día corto (8hr de luz y 16hr de oscuridad) y con una intensidad de 15000 luxes.

Para cuantificar la floración se consideran los días posteriores a la siembra (DPS) que le toma a las plantas desarrollar el escapo de la inflorescencia a 1 cm de altura y el número de hojas de roseta (NHR) que tienen las plantas en ese momento.

Para la estadística se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk para ver como se distribuían los datos y la de Fisher (F-test) para comparar las varianzas. Para la comparación de medias en el caso de los DPS, ya que todas las muestras presentaron una distribución normal, se utilizó la prueba de análisis de varianza ANOVA acompañada de la prueba de Tukey y para el NHR, ya que no todas las muestras se distribuían de manera no normal se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis acompañada de una comparación por pares. Toda la estadística se realizó en el software R Core Team (2016).

6.8 GENERACIÓN DEL DOBLE MUTANTE *ft xa1*.

Para generar el doble mutante se emascularon flores de *ft-10* y se fecundaron con polen del mutante *xa1-2*. Se obtuvieron 4 cruces en la generación F1. Se sembraron en placa 5 semillas de los cuatro cruces F1 y a los 10 días se transplantaron a macetas y se colectaron las hojas de roseta de todas las plantas

para extraerles el ADN y se genotipificaron. Se seleccionó la planta 4 del cruce 2F1 la cual tenía ambas inserciones.

Para la generación F2 se crecieron 50 plantas *in vitro*, a los 10 días se pasaron a tierra y cuando estaban lo suficientemente grandes se procedió a tomar de 2 a 3 hojas de roseta para la extracción de ADN y genotipificación de las 50 plantas, con el fin de encontrar alguna que presentara ambas mutaciones en estado homocigoto.

Ambas mutaciones se deben a una inserción de T-DNA, para poder encontrar a la planta doble homocigota se hicieron amplificaciones por PCR para determinar el genotipo de las plantas (primero la inserción y luego del gen endógeno). Para poder amplificar las inserciones se utiliza un oligonucleótido específico de la inserción de T-DNA y un oligonucleótido de ambos genes y para saber si la planta es homocigota o heterocigota se utilizan oligonucleótidos que flanquean la inserción (Tabla II; Figura 12). Aquellas plantas que amplifican la inserción y el gen endógeno son heterocigotas, las que amplifican la inserción pero no el endógeno son homocigotas y las que no amplificaran la inserción pero si el endógeno son plantas silvestres.

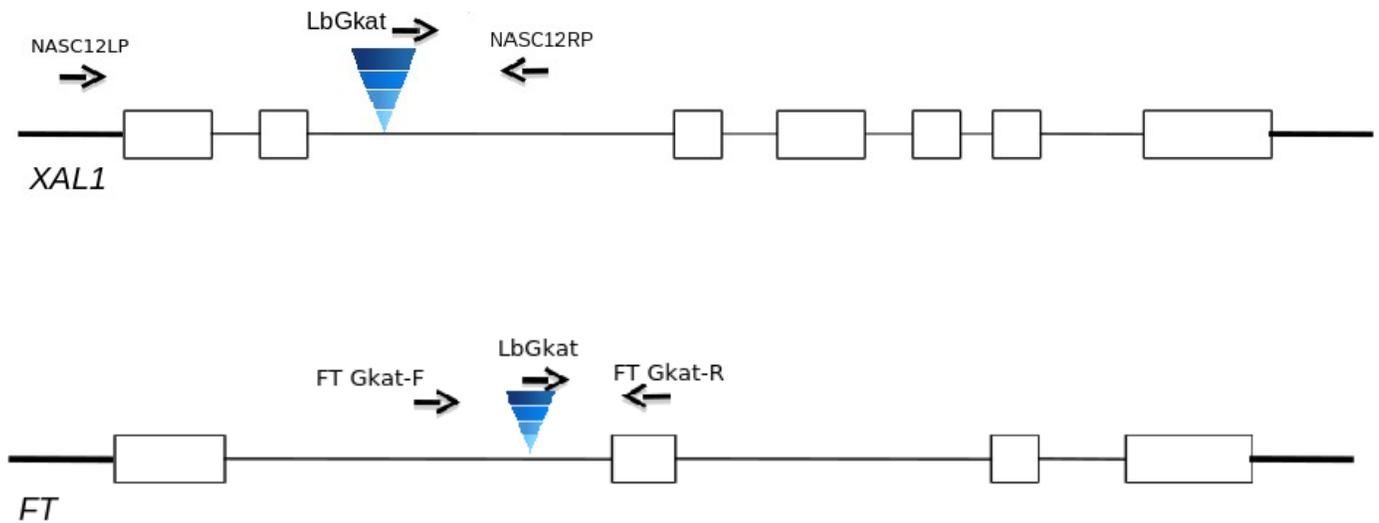


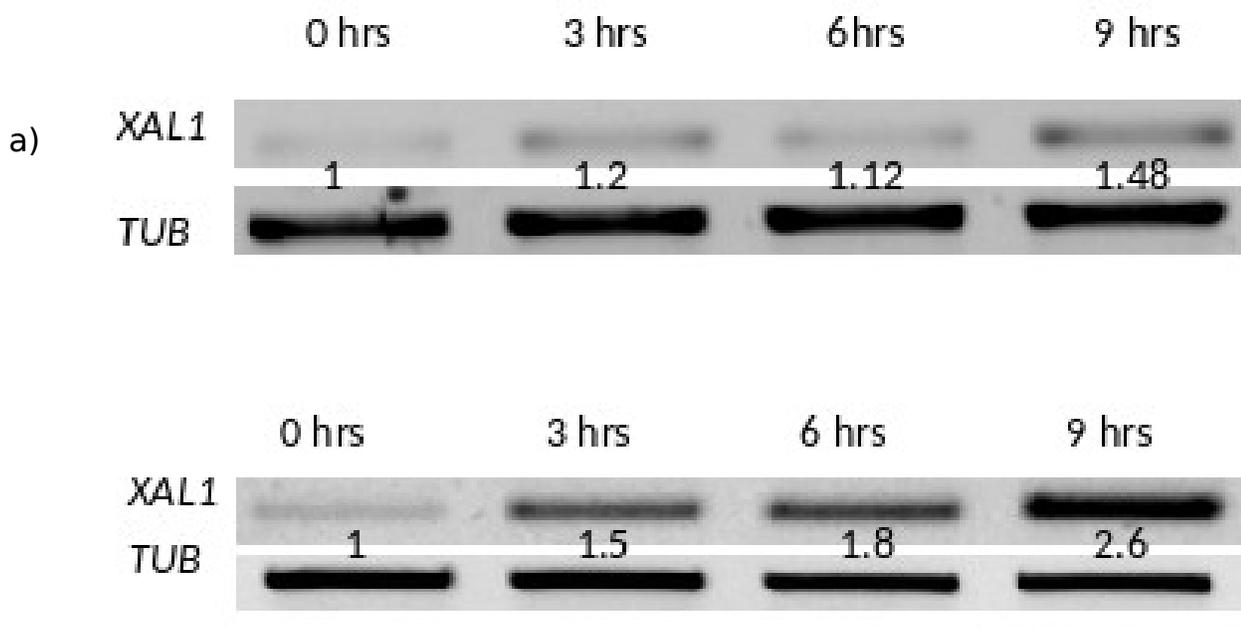
Figura 12. Modelo de los genes mutantes *ft-10* y *xal1-2* donde se muestra el sitio de la inserción de T-DNA y su orientación, así como la posición de los oligonucleótidos utilizados para su genotipificación. Las líneas gruesas representan las regiones UTR, las líneas delgadas representan a los intrones y las cajas a los exones.

Debido a que en la generación F2 no se encontró el doble mutante homocigoto se tomaron las semillas de la planta 20 doble heterocigota y se sembró la F3, para la cual se crecieron 50 plantas *in vitro* que se trasplantaron a los 10 días a tierra, se procedió a tomar material para la extracción de ADN y posterior genotipificación. En este caso además de buscar el doble homocigoto se obtuvo el genotipo de cada planta con el fin de comparar las proporciones genotípicas esperadas.

7. RESULTADOS.

7.1 *XAL1* INCREMENTA SU EXPRESIÓN A LO LARGO DEL DÍA.

Sabemos que los genes que participan en la regulación de la floración en respuesta al fotoperiodo de día largo, se expresan de forma circadiana (Suárez-López P, et al. 2001). Debido a que *XAL1* participa también en dicha respuesta y que al igual que *CO* y *FT* se expresa en el floema (Tapia-López, et al. 2008), es posible que *XAL1* se exprese de forma circadiana. Nosotros observamos sólo si había un cambio en su expresión a lo largo de las horas de luz en la parte aérea de plantas de 14 días post-siembra (dps) (Fig. 13).



b)

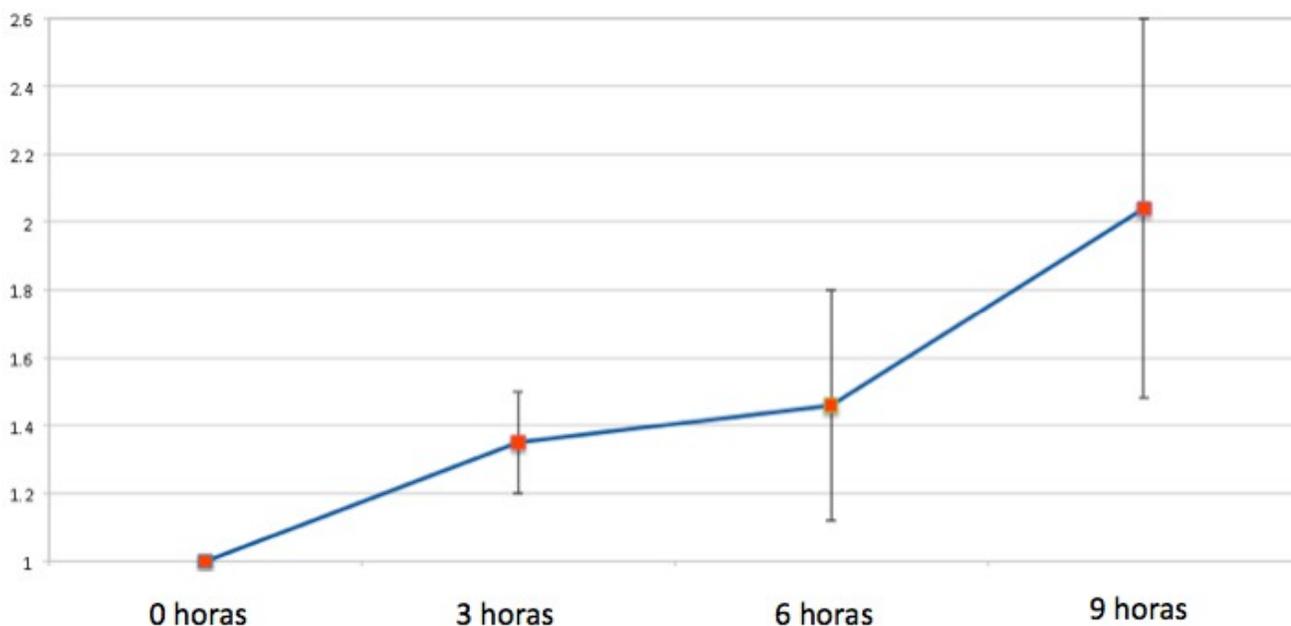


Figura 13. Cinética de expresión de *XAL1* a lo largo de 9 horas de luz con intervalos de 3 horas. a) geles correspondiente a dos experimentos independientes en el que se usó a la *TUBULINA2 (TUB)* como control de carga. Los números corresponden a la cuantificación de las bandas como indicativo de la expresión relativa con respecto al tiempo cero. b) Gráfica donde se muestra el promedio de los niveles de acumulación del ARNm de *XAL1* para ambos experimentos. Con nuestros análisis se observa que *XAL1* tiene poca expresión a las (0) horas, que corresponde a 15 min antes de que se prendan las lámparas y va aumentando a lo largo del día teniendo mayor expresión a las 9 horas de exposición a la luz.

7.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES QUE PARTICIPAN EN LA SEÑALIZACIÓN EN RESPUESTA AL FOTOPERIODO DE DÍA LARGO EN EL DOBLE MUTANTE *co xal1* COMPARADO CON PLANTAS SILVESTRES Y SUS PARENTALES.

CO es uno de los inductores de *FT* y nosotros demostramos aquí y anteriormente que XAL1 también es un regulador positivo de *FT*. Así que una posibilidad es que en el doble mutante *co xal1* que tiene un fenotipo de floración tardía sumatorio en comparación con los mutantes parentales (Domínguez-Román, 2012), se estuvieran reprimiendo aún más blancos comunes a CO y XAL1, entre ellos *FT*. Se procedió a observar la expresión de los genes conocidos en la señalización por fotoperiodo de día largo, tanto en el doble mutante como en los parentales para tratar de explicar el fenotipo observado (Figura 14).

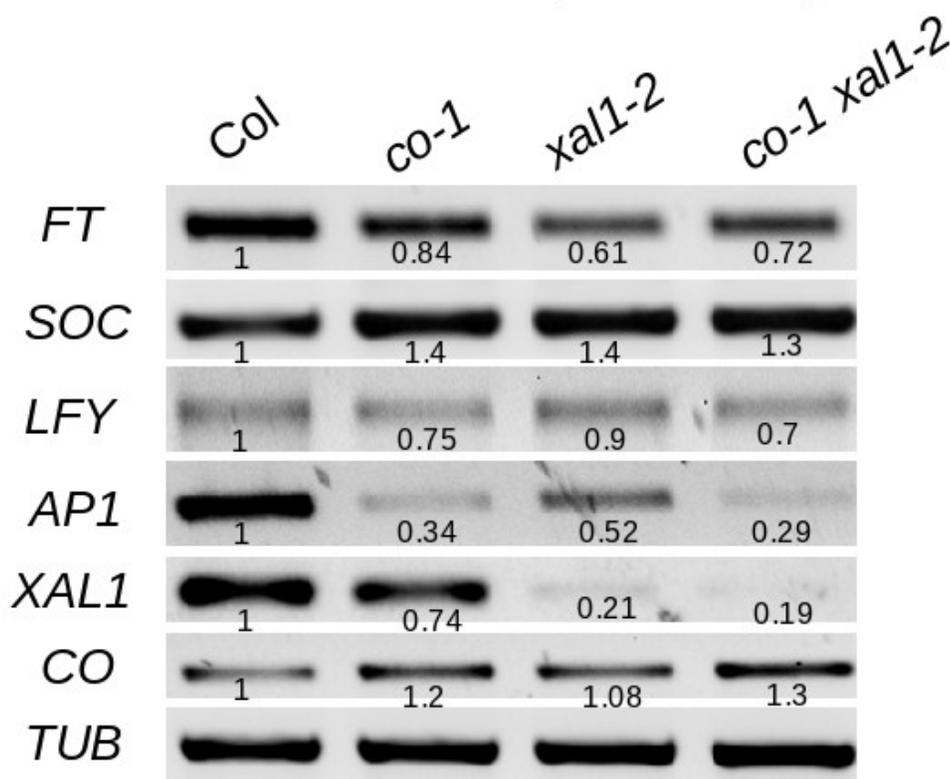


Figura 14. Análisis de expresión de genes que participan en respuesta a la señalización por fotoperiodo de día largo en los mutantes sencillos *co* y *xal1* así como en el doble mutante *co xal1* en plantas de 14 dps. Los números

corresponden a la densidad integrada de cada una de las bandas normalizadas con el valor de densidad integrada de las bandas de tubulinas y tomando como 1 el valor de la línea silvestre (Col).

Los genes *FT*, *SOC*, *LFY* y *AP1* participan en la respuesta a la señalización por fotoperiodo de día largo, en ninguno de ellos se observa disminución de su expresión en el doble mutante que sea aun mayor que los parentales; también se muestra la amplificación de *XAL1* corroborando que en el mutante sencillo *xal1* y en el doble mutante tienen expresión nula. En el caso de *CO* se observa una expresión constitutiva en todas las líneas, debido a que su mutación no se debe a la inserción de un T-DNA que lo haga nulo, si no a un delección que hace a la proteína *CO* no funcional, por lo que no se disminuyen sus niveles de expresión. Con estos resultados es difícil explicar el fenotipo de floración tardía sumatorio del doble mutante, ya que con excepción de *AP1* que disminuye un poco más en el doble mutante con respecto a los parentales, los demás genes que participan en la señalización por fotoperiodo de día largo no disminuyen su expresión. De hecho, aunque *FT* disminuye en ambos mutantes sencillos, en el doble mutante se observa una expresión intermedia con respecto a los parentales y *SOC1* que se sabe que es regulado positivamente por *FT* (ver fig 10), no se encuentra disminuida su expresión en ninguno de los mutantes.

7.3 GI NO ES UN REGULADOR DE XAL1.

En el mutante *co* la expresión de *XAL1* disminuye pero no es completamente nula (Tapia-Lopez, et al. 2008), lo que indica que pudiera(n) existir otro(s) inductores de la expresión de *XAL1*. Por esta razón, quisimos probar si *GI* (un regulador positivo de *CO*), también participa en la regulación de *XAL1*.

Se solicitó un alelo mutante de *gi* (Salk_092757) que se encontraba heterocigoto, por lo que se procedió a genotipificar para obtener una planta homocigota. De una población de 23 plantas se les extrajo el DNA individualmente y se amplificó la inserción del T-DNA y el gen endógeno (ver métodos). Aquellas plantas que se seleccionaron como homocigotas se volvió a corroborar su genotipo que se muestra en la Fig 15.

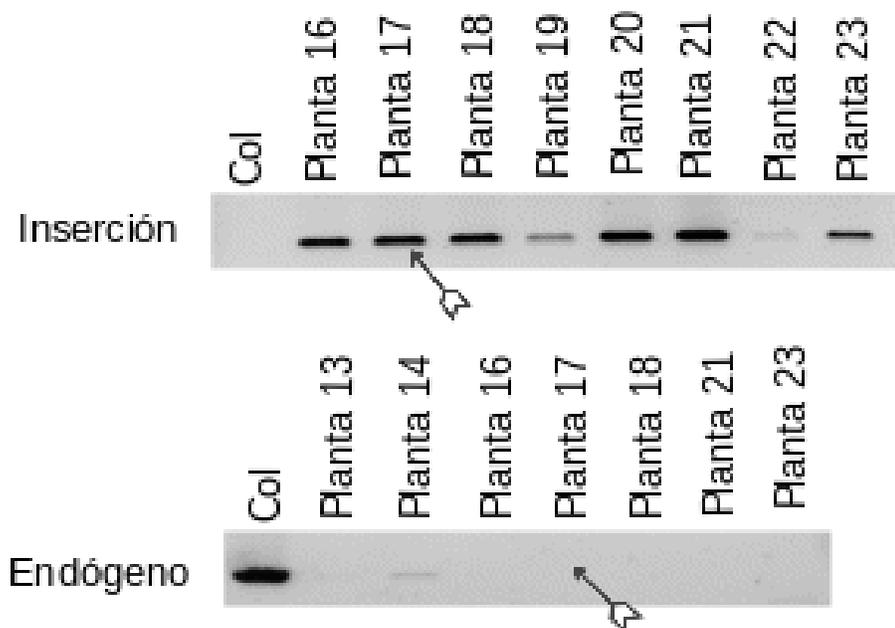


Figura 15. Genotipificación de *gi*. Muestra de las amplificaciones del gen endógeno y la inserción de T-DNA de aquellas plantas que habían sido pre-seleccionadas como homocigotas, así con una planta silvestre (Col) como control. Con la flecha se indica la planta 17 que se utilizó para experimentos posteriores.

Se analizó la expresión de *XAL1* en plantas silvestres y de *gi* a los 14 días de edad. La parte aérea de las plantas se colectó a las 9 horas de luz, que es cuando *XAL1* tiene su pico de expresión y se realizó la RT-PCR (Figura 19).

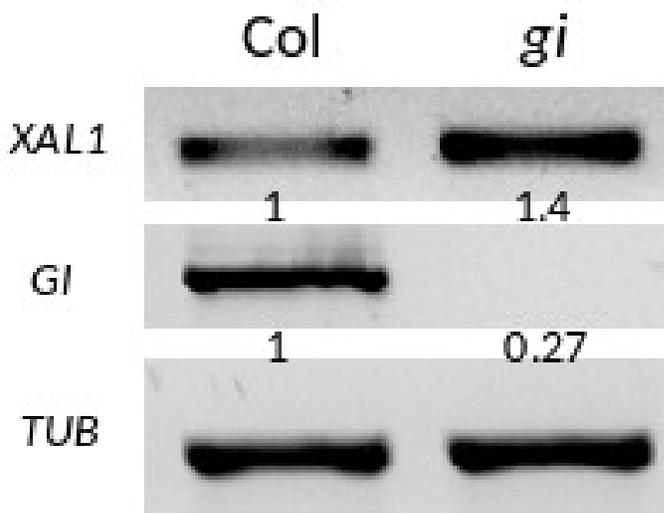


Figura 16. Análisis de expresión de *XAL1* en el fondo mutante *gi* comparado con plantas silvestres. RT-PCR donde se observa que la expresión *XAL1* aumenta un poco en el mutante *gi* cuya expresión es nula. Como control se amplificó el gen *TUB* que expresa de manera constitutiva.

Con este análisis podemos ver que *Gl* no es un regulador positivo de *XAL1* e incluso se observa un leve aumento de ARNm de *XAL1* en el mutante *gi*.

7.4 EL DOBLE MUTANTE *ft xal1* ES LETAL.

Considerando que *XAL1* regula positivamente a *FT*, quisimos establecer de manera genética el tipo de relación que guardan estos dos genes en la floración. Para esto generamos el doble mutante *ft xal1*.

En una muestra de 36 plantas de la generación F2 de la cruce de los mutantes sencillos *ft-10* y *xal1-2*, no se encontró el doble mutante en estado homocigoto, ni siquiera se encontró una planta que fuera homocigota para alguno de los dos genes y heterocigota para el otro, así es que se seleccionó un doble heterocigoto, y se procedió a analizar las proporciones genotípicas de la descendencia en una población de 50 plantas. Nuevamente no se recuperó el doble mutante homocigoto, ni el HO para una mutación / HE para la otra. En la Tabla IV se muestra la comparación entre las proporciones esperadas y las relaciones obtenidas.

Tabla IV. Los 9 genotipos generados en la segregación de dos genes con las proporciones teóricas esperadas y las obtenidas para cada genotipo.

GENOTIPOS	PROPORCIONES ESPERADAS	PROPORCIONES OBTENIDAS
XX FF	3	0
XX Ff ⁺	6	3
Xx ⁺ FF	6	4
Xx ⁺ Ff ⁺	13	16
XX f ⁺ f ⁺	3	11
Xx ⁺ f ⁺ f ⁺	6	0
x ⁺ x ⁺ FF	3	15
x ⁺ x ⁺ Ff ⁺	6	0
x ⁺ x ⁺ f ⁺ f ⁺	3	0

Las letras mayúsculas representan los alelos silvestres *XAL1* (X) y *FT* (F) y las letras minúsculas los alelos mutantes (x⁺ y f⁺).

Estos datos indican que el doble homocigoto regresivo es letal y que existe una dosis-dependencia entre ellos, ya que sólo se requiere que uno de los dos esté en homocigosis y otro en heterocigosis para que sea letal.

7.5 ANÁLISIS DEL TIEMPO DE FLORACIÓN EN PLANTAS SILVESTRES Y EN LOS MUTANTES *xal1*, *co* Y *co xal1* A 27°C.

El fotoperiodo de día largo y la temperatura elevada están muy relacionadas en las zonas donde se distribuye *Arabidopsis* y los mecanismos moleculares también parecen estar ligados, ya que *FT* tiene un papel importante en ambos mecanismos (Pin y Nilsson. 2012; Kumar, et al. 2012; Song, et al. 2013).

XAL1 regula positivamente a *FT* en la condición de fotoperiodo de día largo, por lo que quisimos ver si *XAL1* también participa en la señalización por temperatura elevada. Para poder ver el efecto de la temperatura y que no sea enmascarado

por la señalización del fotoperiodo de día largo, las plantas se crecieron en día corto a una temperatura de 27°C. En la Figura 17 se muestra el tiempo de floración de *xal1*, *co* y el doble mutante en comparación con las plantas silvestres.

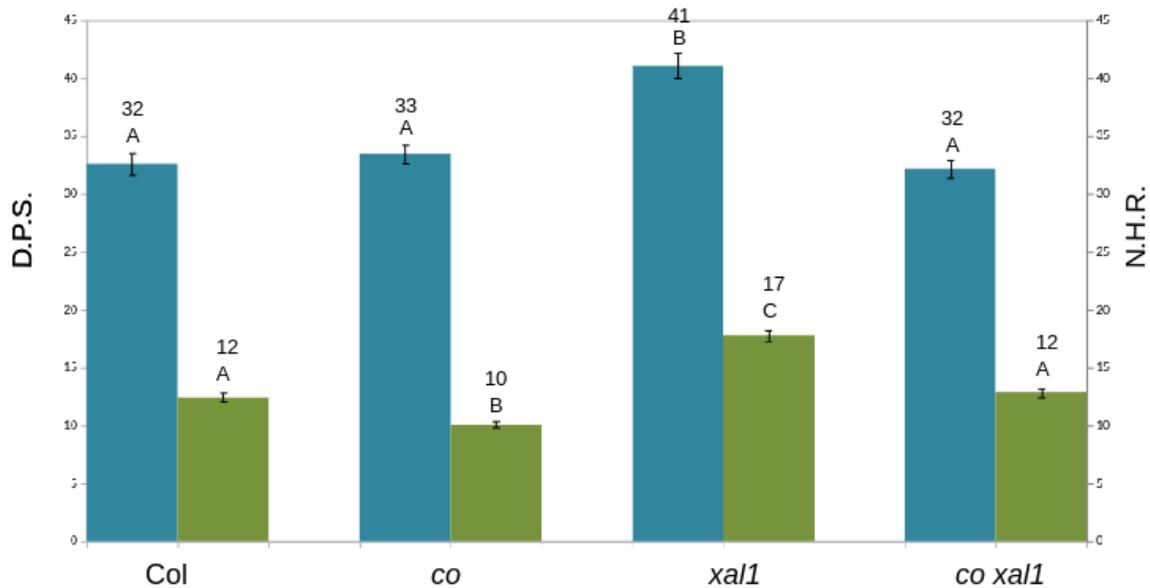


Figura 17. Tiempo de floración en plantas silvestres y los mutantes *co*, *xal* y *co xal1* crecidas en día corto a una temperatura de 27°C. Las letras iguales representa las medias sin diferencias significativas mientras que las letras diferentes representan diferencias significativas con un error del 1%, $p < 0.000001$ ($n = 28-34$ plantas). El eje izquierdo muestra el tiempo de floración en días post-siembra (DPS) y el derecho el número de hojas de roseta (NHR), ambos parámetros con su barra de error estándar .

Sólo el mutante *xal1* mostró un retraso en la transición a la floración en esta condición, tanto en días post-siembra como en el número de hojas de roseta producidas. Estos datos nos indican que XAL1 induce la floración en respuesta a la

temperatura elevada independientemente del fotoperiodo y CO no parece tener un efecto en esta respuesta. Así mismo, *xa1* tiene hojas mas grandes en estado vegetativo que los otros mutantes e incluso que las plantas silvestres a 27°C.

7.6 FENOTIPO DE LA ROSETA DE INDIVIDUOS MUTANTES.

Cuando se midió el tiempo de floración en alta temperatura nos llamó la atención los fenotipos observados en las hojas. Ya que el mutante *xa1* crece con hojas más grandes y elongadas que los otros mutantes e incluso que las plantas silvestres (Figura 18).

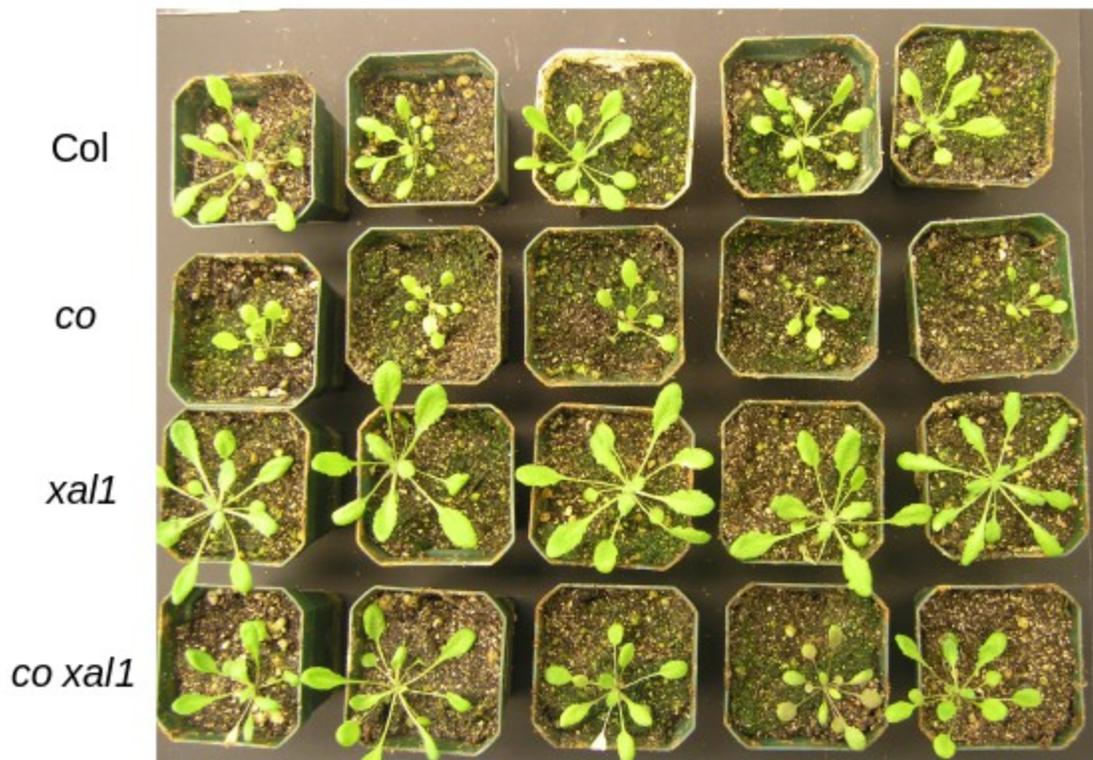


Figura 18. Fenotipos de la roseta de plantas silvestres (Col), mutantes sencillos *co-1* y *xa1-2* y el doble mutante (*co-1 xa1-2*) en condición de día corto y alta temperatura (27°C), a 27 días de edad.

Se podría decir que el mutante *xal1-2* es resistente a la alta temperatura, aún cuando florece más tardíamente que los otros mutantes.

7.7 PIF4 NO REGULA LA EXPRESIÓN DE *XAL1* Y ESTE A SU VEZ NO INDUCE A *FT* EN RESPUESTA A LA TEMPERATURA ELEVADA.

Como se mencionó en antecedentes, PIF4 es un regulador positivo de la floración en respuesta a la temperatura elevada, al inducir la expresión de *FT* (Kumar, et al. 2012). Por lo que quisimos ver si PIF4 podría ser también un activador de *XAL1* y si bajo esta condición *XAL1* induce a *FT*.

Primeramente se ratificó que el mutante *pif4-2* fuera homocigoto, por lo que se llevó a cabo la genotipificación de esta línea (Figura 19).

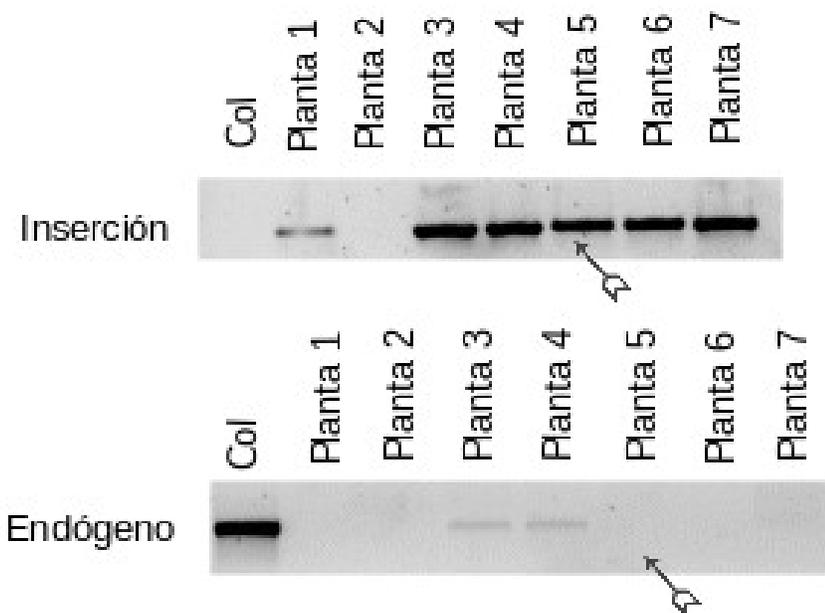


Figura 19. Genotipificación del mutante *pif4-2*, amplificación del gen endógeno y de la inserción de T-DNA con una planta silvestre como control. Para los siguientes experimentos se utilizaron las semillas de la planta 5.

Se crecieron las plantas silvestres y las líneas mutantes *pif4-2* y *xal1-2* en condiciones de alta temperatura y fotoperiodo de día corto durante 14 días y se hicieron los RT-PCR de *XAL1*, *PIF4* y *FT* en tres réplicas biológicas independientes (Figura 20).

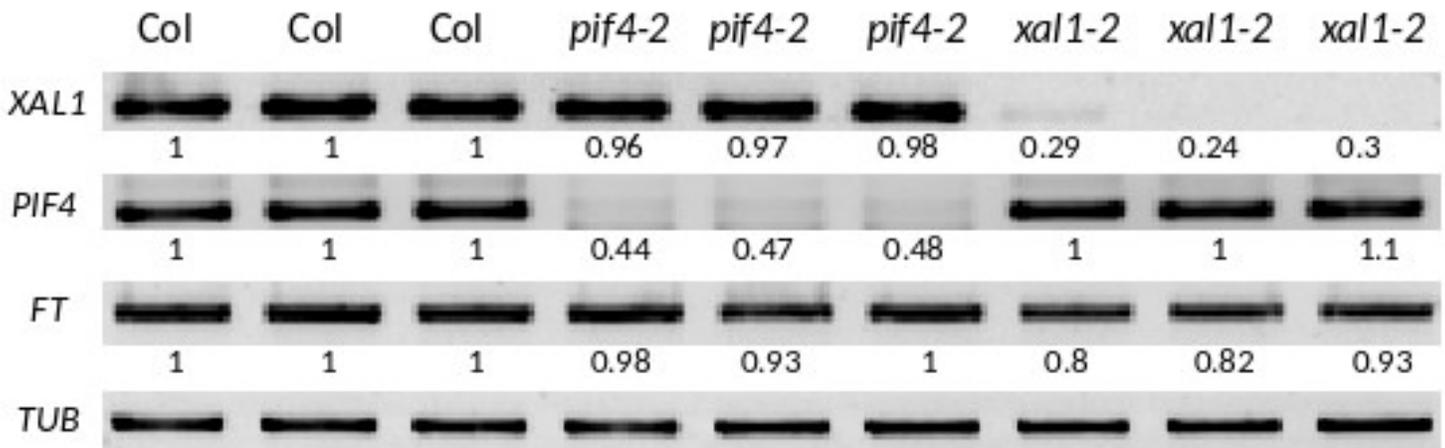


Figura 20. Análisis de la expresión de los genes *XAL1*, *PIF4* y *FT*, en plantas silvestres y los mutantes *pif4-1* y *xal1-2*. *XAL1* no cambia su expresión en el *pif4-2* ni *PIF4* en el mutante *xal1-2*. Tampoco observamos una fuerte inhibición de la expresión de *FT* en ambos mutantes. Como control se amplificó *TUBULINA* (*TUB*) que se expresa de manera constitutiva. Los números corresponden a la densidad integrada de cada una de las bandas normalizadas con el valor de densidad integrada de las bandas de *TUB* y tomando como 1 el valor de la línea silvestre (Col).

Los resultados no mostraron que exista algún tipo de regulación transcripcional entre *PIF4* y *XAL1*, así como tampoco se observó que alguno de los dos genes ejerciera una regulación positiva sobre *FT*.

8. DISCUSIÓN.

8.1 EXPRESIÓN DE *XAL1* A LO LARGO DEL DÍA.

La mayoría de los genes que participan en la detección del fotoperiodo de día largo tienen una regulación circadiana, por lo que es factible pensar que *XAL1* también la tenga. Con nuestros resultados no se puede asegurar que su expresión tenga un comportamiento circadiano, pero si podemos resaltar que su expresión no es constitutiva. Nosotros observamos un incremento de la expresión de *XAL1* conforme pasa el día, dando diferencias claras entre el tiempo 0 y las 9 horas de luz. Este comportamiento es similar a lo que ocurre con otros genes del ciclo circadiano y que participan en la señalización por fotoperiodo de día largo como *GI*, *CO* y *FT* que se expresan mayormente conforme se acerca la noche (Martin-Tryon, et al. 2006; Fornara, et al. 2009). Antes ya habíamos demostrado que la expresión de *XAL1* es dependiente parcialmente de *CO* (Tapia-López et al., 2008) y aquí demostramos que *GI* no lo regula positivamente, por lo que pueden existir otros factores que induzcan su expresión en la tarde.

En *Arabidopsis*, se propone que el reloj circadiano está compuesto por tres ciclos de retroalimentación de la transcripción-traducción interconectados: incluyendo el bucle de la mañana, el bucle central y el bucle de la noche (Anwer y Davis, 2013). El bucle central consiste de dos factores transcripcionales MYB, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (*CCA1*), LATE ELONGATED HYPOCOTYL (*LHY*) y un miembro de la familia de genes reguladores de pseudo-respuesta TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (*TOC1*) (Anwer y Davis, 2013). *CCA1* y *LHY* se expresan en la mañana y reprimen la expresión de *TOC1*. En la tarde *GI* se incrementa y activa la expresión de *TOC1*

y para cuando llega la noche *TOC1* reprime la expresión de *GI* de modo que cuando sale el sol la expresión de *GI* es casi nula (Coupland, et al. 2010).

XAL1 podría estar siendo regulado por factores del bucle central de retroalimentación del reloj circadiano que se han identificado participan en la regulación de *GI* y *CO*. Por ejemplo *CC1* y *LHY* se transcriben en la mañana y reprimen a genes de la “noche” como *TOC1*, *GI*, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* y activa genes de la “mañana” como pueden ser *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 (PRR7)*, *PRR9* entre otros (Anwer y Davis, 2013; Hsu y Harmer 2014).

CC1 y *LHY* podrían inducir la expresión de *XAL1* a medio día haciendo que su expresión vaya aumentando hasta cierto momento, en el que factores de la tarde noche como *TOC*, *REVEILLE 8 (RVE8)* y/o *ELF3* lo repriman durante la noche, ya que su expresión es muy baja antes de que se prendan las luces (Kim, et al. 2005; Mizoguchi, et al. 2011; Hsu y Harmer. 2014).

Por otra parte, tampoco podemos descartar que *XAL1* puede ser inducido por el fotoperiodo de luz, en el que conforme pasa el tiempo se acumula más su mensajero.

Para demostrar que *XAL1* se regula de modo circadiano tendríamos que crecer las plantas silvestres en días medios (12 hrs luz / 12 hrs oscuridad) y tomar muestras cada 2 horas en un ciclo de 24 horas con el fin de observar la expresión de *XAL1* tanto en las horas de luz como de oscuridad. Posteriormente se tendrían

que pasar las plantas a completa obscuridad por otras 24 horas. Si el gen sigue ciclando en la obscuridad, entonces es un gen que se regula de modo circadiano, si se apaga en la obscuridad, es un gen que se regula positivamente por la luz.

8.2 PAPEL DE *XAL1* EN LA RED DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA FLORACIÓN EN CONDICIONES DE FOTOPERIODO DE DÍA LARGO.

En este trabajo tratamos de dar una explicación molecular al fenotipo de floración tardía sumatorio en el doble mutante *co xal1* en comparación con sus parentales, en la condición de fotoperiodo de día largo. Nuestra hipótesis consistía en que ambos genes regulaban positivamente a *FT*, por lo que esperábamos ver una mayor disminución en la expresión de este gen y los que están por debajo de éste, como: *SOC1* y *API1*. Sin embargo, sólo logramos ver un efecto sumatorio en la expresión de *API1* (Figura 14) y no así en *FT*. Con los resultados obtenidos de RT-PCR es difícil dar una explicación al fenotipo de floración tardía de *co xal1*, ya que las diferencias observadas en los fondos mutantes parecen ser muy sutiles por lo que se requeriría de una técnica cuantitativa mediante un PCR de tiempo real, de forma que se pueda ver si la diferencia en la expresión de *API1*, es significativa.

Así mismo, en estos experimentos se tomó toda la parte aérea de la planta, lo que puede diluir el ARN si la expresión es tejido específica. Con un láser de microdissección sería posible extraer únicamente el tejido vascular o el MI, de plantas silvestres y de las líneas mutantes permitiéndonos hacer análisis de expresión mas detallados. Por estas razones, aún no se puede descartar la idea de que tanto *XAL1* como *CO* estén actuando vía *FT*. De hecho, es interesante que los transcritos de *CO*, *XAL1* y *FT* se acumulen en el floema (Takada y Goto, 2003; Tapia Lopez, et al. 2008).

Los genes analizados en este experimento se seleccionaron debido a que participan en la transición a la floración en respuesta al fotoperiodo de día largo (Pin y Nilsson 2012; Song, et al. 2013). Sin embargo la red de transición a la floración es muy grande y existe la posibilidad de que el fenotipo observado se deba a la regulación de otros genes que en este trabajo no analizamos, por ejemplo *FRUITFULL (FUL)*, que es otro MADS-box que se expresa en las hojas y es un promotor de la floración (Martienssen, et al. 1998; Teper-Bamnolker y Samach. 2005). O bien, puede ser que existan otros genes blanco que participan en la floración y que aún no se han descubierto, para lo cual se podría hacer con un análisis de RNAseq en individuos silvestres, mutantes sencillos (*co-1* y *xal1-2*) y el doble mutante *co1 xal1-2*, de modo que se podría ver cuáles son los genes que reducen más su transcripción en este último.

8.3 EL DOBLE MUTANTE *ft xal1* ES LETAL.

Para poder probar la relación genética entre *XAL1* y *FT* se quiso generar el doble mutante *ft xal1* con el fin de observar su fenotipo en condiciones de día largo y compararlo con el fenotipo de *co xal1*. En este trabajo se llegó a la generación F3 sin obtener el doble mutante homocigoto. Al observar que las proporciones obtenidas son muy diferentes a las esperadas proponemos que el doble mutante homocigoto para estos genes es letal (Tabla IV)

FT codifica una proteína de 20 kD, la cual pertenece a la familia de genes *CENTRORADIALIS/TERMINAL FLOWER 1/SELF-PRUNING (CETS)*, los cuales se ha observado tienen un efecto en el crecimiento y desarrollo de las plantas afectando su arquitectura (Kardailsky, et al. 1999; McGarry y Ayre, 2012). De

forma interesante la secuencia de las proteínas de la familia CETS tienen la misma estructura que las proteínas en mamíferos denominadas RAF-kinase-inhibitor protein (RKIP), las cuales se ha demostrado que desempeñan un papel modulador esencial en las cascadas de señalización de varias proteínas quinasa (Teper-Bamnolker y Samach, 2005; Cseh, et al. 2014). En humanos y otros mamíferos se ha identificado que las mutaciones en las proteínas RKIP están asociadas a diversos tipos de cáncer (Bernabé, et al. 2016; Korphaisarn y Kopetz, 2016).

Por otra parte, se ha observado que *XAL1* y otros MADS-box como *FLC*, *FLM*, *AGL15*, *AGL18*, *AGL21* y *AGL23* (Heck, et al. 1995; Burgeff, et al. 2002; Lehti-Shiu, et al., 2005; Colombo, et al. 2008) se expresan en el embrión y están implicados en su desarrollo. Así mismo, un gen homólogo a *FT*, *MOTHER OF FT AND TFL1* (*MFT*) se ha implicado en la semilla (Wanyan et al. 2010). Lo cual nos hace pensar que *XAL1* y *FT* pueden estar participando en el desarrollo del embrión y que su interrelación es importante para su función, ya que existe una dosis dependencia entre ellos: la letalidad se da incluso cuando no está presente alguna proteínas y la otra se encuentra en heterocigosis, o cuando ambas están ausentes (doble homocigoto), pero no en el doble mutante heterocigoto. Para tener un mejor análisis con respecto a este doble mutante se podrían contar las semillas del doble mutante heterocigoto comparándolas con las plantas silvestres y así ver si hay semillas abortadas, o incluso se podrían empezar estudios donde se analicen directamente los diferentes estadios de desarrollo del embrión en el doble mutante y así saber específicamente en que paso se inhibe el desarrollo.

8.4 XAL1 EN LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN EN RESPUESTA A LA TEMPERATURA ELEVADA.

Debido a que tanto el fotoperiodo de día largo como el incremento en la temperatura van de la mano en la inducción del tiempo de floración en *Arabidopsis*, los mecanismos a nivel molecular también podrían estar conservados, tal como sea observado en la regulación positiva de *FT* por ambos estímulos (Imaizum, et al. 2013; Coupland, et al. 2016).

En este trabajo se demostró que *XAL1* participa en la señalización de la temperatura elevada presentando un fenotipo de floración tardía con respecto a las plantas silvestres (Figura 18). Por lo tanto, *XAL1* induce la floración en respuesta a ambas condiciones (fotoperiodo día largo y 27°C en fotoperiodo de día corto). Sin embargo *PIF4*, que se sabe tiene un papel en la señalización de la temperatura elevada, no regula la expresión de *XAL1* ni visceversa (Figura 20). En esta figura tampoco se observa una disminución de la expresión *FT* en el mutante *pif4-2* debido a que con este método semicuantitativo no es posible ver las diferencias que se reportan por Kumar, et al. 2012, en las cuales con un análisis cuantitativo se observa una expresión relativa de *FT* de 0.006 en las plantas silvestres y de 0.002 en el mutante *pif4-1* en condición de día corto y 27°C, la diferencia es muy poca para ser apreciada en una PCR de punto final como la que se muestra en la figura 20.

La investigación de la señalización por alta temperatura en floración es relativamente reciente y conocemos muy poco, por lo mismo sólo sabemos que *PIF4* y *PIF5* activan la expresión de *FT* en esta condición (Nozue, et al. 2007;

kumar, et al. 2012; Thines, et al. 2014). Otra forma de regulación que se ha observado ocurre en los genes con dominio MADS, implica la desestabilización de complejos protéicos, donde participa SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) y FLOWERING LOCUS M (*FLM*) otros dos factores transcripcionales con dominio MADS. Resulta interesante que *FLM* mediante splicing alternativo genera dos variantes de ARNm que a su vez se traducen en dos variedades de proteínas FLM-b y FLM-d. Ambas proteínas interactúan con SVP produciendo dos heterodímeros SVP-FLM-b y SVP-FLM-d, que tienen diferentes funciones: SVP-FLM-b se une al DNA e inhibe la floración al disminuir la expresión de *FT* y *TWIN SISTER OF FT (TSF)* en las hojas y a *SOC1* en el meristemo apical, mientras que SVP-FLM-d no se une al DNA (Lee, et al. 2013; Pose, et al. 2013). Se ha observado que a 27°C aumenta el ARNm de FLM-d incrementando así la cantidad de heterodímeros SVP-FLM-d los cuales no tienen actividad como represores de la floración, lo que provoca que se adelante la floración (Lee, et al. 2013; Pose, et al. 2013). XAL1 podría también estar participando junto con otros factores transcripcionales MADS-box en la señalización por alta temperatura formando heterodímeros que activen la floración en lugar de inhibirla.

Muy recientemente se reportó que CO también participa en la detección de la alta temperatura activando a *FT* independientemente de los PIFs, e incluso comparativamente en el mutante *co-1* los autores encuentran mayor disminución de *FT* que en el mutante *pif4-2* y *pif5-3* (Coupland, et al. 2016). En nuestro trabajo no se encontró que el mutante sencillo de *co-1* ni el doble mutante *co-1 xal1-2* presentaran diferencias en la transición a la floración en comparación con las

plantas silvestres, e incluso se observó un menor número de hojas de roseta en el mutante *co-1* con respecto a plantas silvestres (Figura 17). Estas diferencias pueden deberse a la metodología empleada, por ejemplo, en el trabajo de Coupland, et al. (2016), las semillas las germinaron 24 horas en condiciones de día largo a 21°C y posteriormente las pasaron a día corto y 27°C, mientras que nosotros las germinamos directamente en esta condición de alta temperatura y día corto. Para poder comprender mejor el papel de *XAL1* en esta señalización valdría la pena realizar un estudio transcriptómico en el mutante para conocer posibles genes blanco de *XAL1* en temperatura elevada.

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

- *XAL1* incrementa su expresión a lo largo del día, siendo más abundante su mensajero a las 9 horas de luz.
- *FT* no es el responsable del fenotipo del doble mutante *co-1 xal1-2*. *XAL1* y *CO* posiblemente regulan de forma conjunta a *AP1* y otros genes no analizados.
- *GI* no es un regulador positivo de *XAL1* en fotoperiodo de día largo.
- El doble mutante *ft-10 xal1-2* es letal.
- *XAL1* participa en la transición a la floración en respuesta a la temperatura elevada, independientemente de PIF4.

Para poder determinar si *XAL1* es un gen que se regula circadianamente se propone analizar la expresión de *XAL1* cada 2 horas durante un periodo de 24 horas con fotoperiodo de día intermedio con el fin de ver la expresión del gen tanto en luz como en la oscuridad. Para entender el fenotipo del doble mutante *co xal1* se podría realizar un análisis de RNA-seq comparándolo con los mutantes sencillos y plantas silvestres y también se podrían hacer los RT-PCRs tejido específico. Resultaría interesante analizar la expresión de *FT:GUS* en el floema en el mutante de *XAL1*.

Para poder investigar más sobre la letalidad del doble mutante *ft xal1* se propone cuantificar el número de semillas muertas en el doble mutante *ft xal1* y observar si hay defectos en el desarrollo embrionario.

Para continuar investigando el papel de *XAL1* en la condición de alta temperatura se propone hacer un análisis de expresión cuantitativa del gen *FT* en la línea mutante *xal1-2* crecida 24 horas en condiciones de fotoperiodo de día largo a 22°C, para después pasarlas a condiciones de día corto y 27°C, con el fin de ver si *XAL1* regula la expresión de *FT* en estas condiciones.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Adamczyk, B. J., Lehti-Shiu, M. D. and Fernandez, D. E. (2007). The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50, 1007-1019.
2. Alvarez Buylla E. R., Corvera Poiré A., Garay Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes Miranda F. and Pérez Ruíz R. (2011). A MADS View of Plant Development and Evolution. Transworld Research Network. Pp 181-220.
3. Anwer MU and Davis SJ (2013). An overview of natural variation studies in the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24: 422– 429.
4. Balasubramanian Sureshkumar, Sureshkumar Sridevi, Lempe Janne, Weigel D. (2006). Potent Induction of *Arabidopsis thaliana* Flowering by Elevated Growth Temperature. *PloS Genet* Vol. 2(7): e106.
5. Barton M. K. and Poethig R. S. (1994). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* Vol. 119, 823-831.
6. Barton M.K. (2010). Twenty years on: The inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo *Developmental Biology* Vol. 341 95-113.
7. Benlloch-Reyes BA., Serrano-Mislata and Madueño F. (2007). Floral Initiation and Inflorescence Architecture: A Comparative View. *Annals of Botany* Vol 100: 659–676.
8. Bernabé R., Patrao A., Cartel L., Blackhall F and Dean E. (2016). Selumetinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. Posted online on July 28, 2016.
9. Burgeff C., Liljegren S. J., Tapia-López R., Yanofsky M. F. and Alvarez-Buylla E. R. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* Vol. 214(3):365-72.
10. Brand U., Fletcher JC., Hobe M., Meyerowitz E. M. and Simon R. (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*. Vol. 28;289(5479):617-9.
11. Clark S. E., Running M. P. and Meyerowitz E. M. (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119, 397-418.
12. Colombo M., Masiero S., Vanzulli S., Lardelli P., Kater M. M. and Colombo L. (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* Vol. 54, 1037-1048.
13. Corbesier L. and Coupland G. (2006). The quest for florigen: a review of recent progress. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 57, No. 13, pp. 3395–3403.
14. Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Seale I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C. and Coupland G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*. Vol. 18;316(5827):1030-3.
15. Coupland G., Mizoguchi T., Wheatley K., Hanzawa Y., Wright L., Mizoguchi M., Song H. R. and Carré I. A. (2002). LHY and CCA1 Are Partially Redundant Genes Required to Maintain Circadian Rhythms in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, Vol. 2, 629–641.
16. Coupland G., de Montaigu A. y Toth R. (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends in Genetics*. Vol. 26, p296-306.
17. Coupland G., Fernández V., Takahashi Y., and Gourrierc J. L. (2016). Photoperiodic and thermosensory pathways interact through CONSTANS to promote flowering at high temperature under short days. *The Plant Journal* Vol. 86, 426–440.

18. Cristel C. and Fletcher J. C. (2003). Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *TRENDS in Plant Science* Vol.8 No.8
19. Cseh B., Doma E. and Baccharini M. (2014). "RAF" neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. *FEBS Letters* Vol. 588 2398–2406.
20. De Bodt S., Raes J., Florquin K., Rombauts S., Rouzé P., Theissen G. and Van de Peer Y. (2003). Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *Journal of Molecular Evolution*. Vol. 56 No. 5 pp. 573-586.
21. De Folter S., Immink R. G., Kieffer M., Parenicová L., Henz S. R., Weigel D., Busscher M., Kooiker M., Colombo L., Kater M. M., Davies B. and Angeney G. C. (2005). Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell*. Vol. 17(5):1424-33.
22. Dodsworth S. (2009). A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Developmental Biology* Vol. 336 1–9.
23. Domínguez-Román A. (2012). Estudio de algunos genes MADS-Box y sus interacciones genéticas en la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
24. Fornara F., de Montaigu A., y Coupland G. (2010). SnapShot: Control of Flowering in Arabidopsis. *Cell* Vol. 141. pp150.
25. Fornara F., Panigrahi K. C. S., Gissot L., Sauerbrunn N., Rühl M, Jarillo J. A., and Coupland G. (2009). Arabidopsis DOF Transcription Factors Act Redundantly to Reduce CONSTANS Expression and Are Essential for a Photoperiodic Flowering Response. *Developmental Cell* Vol. 17, 75–86.
26. Fowler S., Lee K., Onouchi H., Samach A., Richardson K., Morris B., Coupland G. and 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. *The EMBO Journal*. Vol. 18 No.17 pp.4679–4688.
27. Groß-Hardt R. and Laux T. (2003). Stem cell regulation in the shoot meristem. *Journal of Cell Science*. Vol. 116 1659-1666.
28. Hartmann U., Höhmann S., Nettlesheim K., Wisman E., Saedler H. and Huijser P. (2000). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J*. 21, 351-360.
29. 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. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*. Vol. 55(2), 253-265.
30. Heck G. R., Perry S. E., Nichols K. W. and Fernandez D. E. (1995). AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. *Plant Cell* Vol. 7, 1271-1282.
31. Hoong-Yeet Y., Jalan M. S., Bukit B. R. and Kuala L. (2013). Solar rhythm in the regulation of photoperiodic flowering of long-day and short-day plants. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 64, No. 10. pp. 2643–2652.
32. Hsu P. Y. and Harmer S. L. (2014). Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends in Plant Science*, Vol. 19, No. 4.
33. Imaizumi T. and Kay S. (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence *TRENDS in Plant Science* Vol.11 No.11.
34. Imaizumi T., Schultz T. F., Harmon F. G. and Ho L. A., Kay S. A. (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science*. Vol. 309:293–297.
35. Imaizumi T., Ito S. and Song Y. H. 2013. Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends in Plant Science*, Vol. 18, No. 10

36. Irish V. F. and Sussex I. M. (1990). Function of the *apetala-1* Gene during Arabidopsis Floral Development. *The Plant Cell*. Vol. 2, 741-753.
37. Jackson S. D. (2008). Plant responses to photoperiod. *New Phytologist*. Vol. 181: 517–531.
38. Jang S, Marchal V, Panigrahi KC, Wenkel S, Soppe W, Deng XW and Valverde F, Coupland G. (2008). Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO Journal*. Vol. 23;27(8):1277-88.
39. Kardailsky I., Shukla V.K., Ahn J.H., Dagenais N., Christensen S. K., Nguyen J. T., Chory J., Harrison M. J. and Weigel D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* Vol. 286, 1962–1965.
40. Kim, W. Y., Hicks K. A. and Somers D. E. (2005). Independent roles for EARLY FLOWERING 3 and ZEITLUPE in the control of circadian timing, hypocotyls length and flowering time. *Plant Physiology* Vol. 139, 1557–1569.
41. Kobayashi Y. and Weigel D. 2007. Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev*. Vol. 1;21(19):2371-84.
42. Koini M. A., Alvey L., Allen T., Tilley C. A., Harberd N. P., Whitelam G. C. and Franklin K. (2009). High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology*. Vol. 19 408–413.
43. Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, Mizuno S, Kakimoto T, Fukuda H and Sakagami Y. (2006). A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science*. Vol. 11;313(5788):845-8.
44. Korphaisarn K. and Kopetz S. (2016). BRAF-Directed Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer* Vol. 22(3):175-8.
45. Kumar S. V., Lucyshyn D., Jaeger K. E., Alós E., Alvey E., Harberd N. P. and Wigge P. (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*. doi:10.1038/nature10928.
46. Laufs P., Grandjean O., Jonak C., Kiêu K. and Traasa J. (1998). Cellular Parameters of the Shoot Apical Meristem in Arabidopsis. *The Plant Cell*, Vol. 10, 1375–1389.
47. Laux T., Mayer K. F., Berger J. and Jürgens G. (1996) The WUSCHEL gene is required for shoot and floralmeristem integrity in Arabidopsis. *Development* Vol. 122, 87-96.
48. Lee H., Suh S. S., Park E., Cho E., Ahn J. H., Kim S. G., Lee J. S., Kwon Y. M. and Lee I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes Dev*. 14, 2366-2376.
49. Lee J. H., Ryu H. S., Chung K. S., Pose D., Kim S., Schmid M. and Ahn J. H. (2013) Regulation of temperature-responsive flowering by MADS-box transcription factor repressors. *Science* Vol 342, 628–632.
50. Lehti-Shiu M. D., Adamczyk B. J. And Fernandez D. E. (2005). Expression of MADS-box genes during the embryonic phase in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*. Vol. 58(1):89-107.
51. Maizel A, Busch MA, Tanahashi T, Perkovic J, Kato M, Hasebe M and Weigel D. (2005). The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science*. Vol. 8;308(5719):260-3.
52. Mandel M. A., Gustafson-Brown C., Savidge B. and Yanofsky M. F. (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature*. Vol. 19;360(6401):273-7.
53. Mandel M. A. and Yanofsky M. F. (1995) The Arabidopsis AGL8 MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by APETALA1. *Plant Cell*. Vol. 7(11);1763-71.

54. Martienssen R., Gu Q., Ferrándiz C. and Yanofsk M. F. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development* Vol. 125, 1509-1517.
55. Martin-Tryon E. L., Kreps J. A. and Harmer S. L. (2006). GIGANTEA Acts in Blue Light Signaling and Has Biochemically Separable Roles in Circadian Clock and Flowering Time Regulation. *Plant Physiology*, Vol. 143, pp. 473–486.
56. Matsoukas G., Massiah A. and Thomas B. (2012). Florigenic and Antiflorigenic Signaling in Plants. *Plant Cell Physiol.* Vol. 53(11): 1827–1842.
57. McGarry R. C. and Ayre B. G. (2012). Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Science* Vol. 188–189 71–81.
58. Michaels S. D., Ditta G., Gustafson-Brown C., Pelaz S., Yanofsky M. and Amasino R. M. (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *Plant J.* Vol. 33, 867-874.
59. Mizoguchi T., Nefissi R., Natsui Y., Miyata K. and Ghorbel A. (2011). Roles of Circadian Clock in Developmental Controls and Stress Responses in Arabidopsis: Exploring a Link for Three Components of Clock Function in Arabidopsis. *Advances in Botanical Research*, Vol. 57.
60. Moon J., Suh S. S., Lee H., Choi K. R., Hong C. B., Paek N. C., Kim S. G. and Lee I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal* Vol. 35, 613–623.
61. Morris K., Thornber S., Codrai L., Richardson C., Craig A., Sadanandom A., Thomas B. and Jackson S. (2010). DAY NEUTRAL FLOWERING Represses CONSTANS to Prevent Arabidopsis Flowering Early in Short Days. *The Plant Cell.* Vol. 22: 1118–1128.
62. Müller R., Borghi L., Kwiatkowska D., Laufs P. and Simon R. (2006). Dynamic and Compensatory Responses of Arabidopsis Shoot and Floral Meristems to CLV3 Signaling. *The Plant Cell*, Vol. 18, 1188–1198.
63. Nozue K., Covington M. F., Duek P. D., Lorrain S., Fankhauser C., Harmer S. L. and Maloof J. N. (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature.* Vol. 448, 358-361.
64. Paniagua-Gómez-Alvarez R., Serrano M. M., Sesma-Egozcue M. P., Alvarez-Uría R. V. M., Anadón-Alvarez R., Fraile L. B. and Sáez-Crespo F. J. (2002). *Citología e Histología Vegetal y Animal.* 3 edición ED. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA. España.
65. Pérez-Ruiz R., García-Ponce B., Marsch-Martínez N., Ugartechea-Chirino Y., Villajuana-Bonequi M., Folter S., Azpeitia E., Dávila-Velderrain J., Cruz-Sánchez D., Garay-Arroyo A, Paz-Sánchez M., Estévez-Palmas J. and Álvarez-Buylla E. (2015). XAANTAL2 (AGL14) Is an Important Component of the Complex Gene Regulatory Network that Underlies Arabidopsis Shoot Apical Meristem Transitions. *Molecular Plant* Vol. 8, 796–813.
66. Pin P. A. and Nilsson O. (2012). The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development. *Plant, Cell and Environment* Vol. 35, 1742–1755.
67. Pose D., Verhage L., Ott F., Yant L., Mathieu J., Angenent G. C., Immink R. G. and Schmid M. (2013) Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature*, Vol. 503, 414–417.
68. Prat S. and Lucas M. (2014). PIFs get Bright: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS as integrators of light and hormonal signals. *New Phytologist.* Vol. 202: 1126–1141.
69. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

70. Ratcliffe O. J., Nadzan G. C., Reuber T. L. and Riechmann J. L. (2001). Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an FLC homologue. *Plant Physiol.* Vol. 126, 122-132.
71. Shannon S. and Meeks-Wagner O. R. (1991). A Mutation in the *Arabidopsis* TFL1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development *The Plant Cell.* Vol. 3, 877-892.
72. Sawa M., Nusinow D. A., Kay S. A. and Imaizumi T. (2007). FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in *Arabidopsis*. *Science.* Vol. 318.
73. Schönrock N., Bouveret R., Leroy O., Borghi L., Köhler C., Grissem W. and Hennig L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev.* Vol. 20, 1667-1678.
74. Seosamh O. D., Graciet E. and Wellmer F. (2013). Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytologist.* Vol. 201: 16–30.
75. Song Y. H., Ito S. and Imaizumi T. 2013. Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends Plant Sci.* Vol. 18(10):575-8311
76. Smaczniak C., Immink R. G. H., Angenent G. C. and Kaufmann K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development.* Vol. 139, 3081-3098.
77. Taiz L. and Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*. 3rd Edition. Published by Sinauer Associates Inc.
78. Takada S., and Goto K. (2003). TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* Vol. 15, 2856–2865.
79. Tapia-Lopez R., García-Ponce B., Dubrovsky J. G., Garay-Arroyo A., Perez-Ruiz R. V., Hyung K. S., Acevedo F., Pelaz S. and Alvarez-Buylla E. (2008). An AGAMOUS Related MADS Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* Vol. 146, pp. 1182–1192.
80. Teper-Bamnolker P. and Samach A. (2005). The Flowering Integrator FT Regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL Accumulation in *Arabidopsis* Leaves. *The Plant Cell,* Vol. 17, 2661–2675.
81. Theissen G. and Saedler H. (2001). *Plant biology.* Floral quartets. *Nature* Vol. 409, 469-471.
82. Thines B. C., Youn Y., Duarte M. I. and Harmon F. G. (2014). The time of day effects of warm temperature on flowering time involve PIF4 and PIF5. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 65, No. 4, pp. 1141–1151.
83. Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A. and Coupland G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science.* Vol. 13;303(5660):1003-6.
84. Wahl V., Ponnu J., Schlereth A., Arrivault S., Langenecker T., Franke A., Feil R., Lunn J. E., Stitt M. and Schmid M. (2013). Regulation of Flowering by Trehalose-6-Phosphate Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* Vol. 339 , 704.
85. Wanyan X., Chang L., Xingliang H., and Hao Y. (2010). MOTHER OF FT AND TFL1 Regulates Seed Germination through a Negative Feedback Loop Modulating ABA Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell,* Vol. 22: 1733–1748.
86. Weigel D., Alvarez J., Smyth D. R., Yanofsky M. F., and Meyerowitz E. M. (1992). LEAFY Controls Floral Meristem Identity in *Arabidopsis*. *Cell,* Vol. 69, 643-659.
87. Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., Gourrierc J. L., Samach A. and 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*, Vol. 18, 2971–2984.
88. Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., Le Gourrierc J., Samach A. and Coupland G. (2006). CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis. *Plant Cell*. Vol. 8(11):2971-84
 89. Wils C. R. and Kaufmann K. (2016). Gene-regulatory networks controlling inflorescence and flower development in *Arabidopsis thaliana*. Institute for Biochemistry and Biology, University of Potsdam, 14476 Potsdam, Germany.
 90. Yadav R. K., Girke T., Pasala S., Xie M. and Reddy G. V. (2009) Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *PNAS*. Vol. 106, no. 12, 4941– 4946.
 91. Yanofsky M. F., Ma H., Bowman J. L., Drews G. N., Feldmann† K. A. and Meyerowitz E. (1990). The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*. Vol. 346, 35 – 39.
 92. Yanofsky M. F., Liljegren S. J., Gustafson B. C., Pinyopich A. and Ditta G. S. (1999). Interactions among *APETALA1* , *LEAFY* , and *TERMINAL FLOWER1* Specify Meristem Fate. *The Plant Cell*, Vol. 11, 1007–1018.
 93. Yanovsky M. J. and Kay S. A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature*. Vol. 419, 308–312.