



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Regulación entre algunos miembros de las familias
de factores transcripcionales MADS-box y SPL en
las hojas y el ápice de *Arabidopsis thaliana*
(Brassicaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDUARDO TORRES FLORES



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN**
Ciudad de México, 2021



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.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre (s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas
Año

1. Datos del alumno

Torres
Flores
Eduardo
55-1698-7270
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312189161

2. Datos del tutor

Doctora
Berenice
García
Ponce de León

3. Datos del sinodal 1

Doctora
Rosalinda
Tapia
López

4. Datos del sinodal 2

Doctora
Guillermina
Murguía
Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Doctor
Jorge Antonio
García
Álvarez

6. Datos del sinodal 4

Doctor
José Eduardo
Rodríguez
Bustamante

7. Datos del trabajo escrito

Regulación entre algunos miembros de las familias de factores transcripcionales MADS-box y SPL en las hojas y el ápice de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)

79 pp.
2021

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

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, a quien agradezco por el tiempo y los conocimientos compartidos durante la realización de esta investigación.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN206220; IN200920, IN203220 e IN211721 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Adriana Garay Arroyo, Elena Alvarez-Buylla y María de la Paz Sánchez y los proyectos CONACyT 102987 y 102959 (de AGA y MPS) a quienes les agradecemos su apoyo.

A los miembros de mi jurado:

Dra. Rosalinda Tapia López

Dra. Guillermina Murguía Sánchez

Dra. Berenice García Ponce de León

Dr. Jorge Antonio García Álvarez

Dr. José Eduardo Rodríguez Bustamante

por sus valiosas contribuciones a este trabajo.

Al Dr. Charles Stewart Gillmor III, que nos proporcionó las semillas de las líneas mutantes de los genes *SPL* utilizadas en este trabajo.

A la Dra. María Teresa Romero Romero, la Dra. Diana Belén Sánchez y Laura Estela Rodríguez Ávila quienes me brindaron su apoyo en la preparación de soluciones y materiales utilizados en este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi mamá por su amor y apoyo incondicional. La persona que siempre me ha impulsado a dar lo mejor de mí. Te amo.

A mis abuelos, Héctor y mis hermanos (Charly, Jimena y Emmanuel) por estar ahí siempre, gracias por el cariño y confianza que me han brindado.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, especialmente a Brandon, Caro, Tania, Fer y Nadia por sus enseñanzas, las risas y charlas interminables.

A mis amigos de museo: jardincitas, Yhess, Yolito, Fridis, Rebe y Carlitos, nunca dejemos de brillar. Vane, Aza, Gaby, Zai, Pili y Jenny, gracias por enseñarme el verdadero valor de la amistad. Ale, gracias por esos momentos en que nos escuchamos mutuamente. Mis grandes compañeros y amigos del MHNCA.

A Anita y Ruth por tantos años de amistad, hermandad y cariño.

A Jess, florecilla gracias por tus palabras siempre atinadas, por tu amistad y sin fin muestras de cariño.

A Hugo por recordarme que siempre vale la pena intentarlo sin miedo, never one without the other.

Índice

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 TRANSICIONES DE FASE EN EL DESARROLLO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	5
1.1.1 FASE VEGETATIVA	5
1.1.2 TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN	10
1.2 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SPLS	15
1.2.1 REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN VEGETATIVA MEDIADA POR LOS SPLS	17
1.2.2 LOS FACTORES SPLS EN LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN	19
1.3 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MADS-BOX COMO REGULADORES DEL DESARROLLO EN PLANTAS	20
1.4 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL ENTRE ALGUNOS MADS-BOX Y SPLS DURANTE LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN	23
2. ANTECEDENTES	24
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVO GENERAL	28
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 LÍNEAS DE PLANTAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	29
5.2 COLECTA DEL MATERIAL, EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL RNA	30
5.3 RT-PCR SEMICUANTITATIVA	31
5.4 DENSITOMETRÍA	33
6. RESULTADOS	34
6.1 COMPROBACIÓN DE LA FALTA DE ACUMULACIÓN DE LOS TRANSCRITOS <i>SPL</i> EN SUS RESPECTIVOS MUTANTES	34
6.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE <i>AGL19</i> POR <i>SPL3</i> , <i>SPL9</i> Y <i>SPL15</i>	35
6.3 <i>SPL3</i> , <i>SPL5</i> , <i>SPL9</i> Y <i>SPL15</i> REGULAN A <i>XAL1</i> Y <i>XAL2</i>	38
6.4 <i>XAL1</i> Y <i>XAL2</i> PUEDEN REGULAR A LOS <i>SPLS</i>	40
7. DISCUSIÓN	43

7.1 LA REGULACIÓN DE <i>AGL19</i> POR LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SPLS SUGIERE UN PAPEL DE ESTE MADS-BOX EN EL CONTROL DE LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN EN DÍA LARGO	43
7.2 REGULACIÓN DE LA TRANSICIÓN A LA FLORACIÓN EN RESPUESTA A DÍA LARGO MEDIADA POR XAL1 Y LOS FACTORES SPLS	44
7.3 XAL2 Y LOS SPLS INTEGRAN DISTINTAS SEÑALES QUE INDUCEN LA FLORACIÓN	45
7.4 LA RELACIÓN ENTRE LOS MADS-BOX Y LOS SPLS EN LA TRANSICIÓN REPRODUCTIVA PODRÍA ESTAR CONSERVADA	47
<u>8. CONCLUSIONES</u>	<u>51</u>
<u>9. PERSPECTIVAS</u>	<u>52</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>53</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>72</u>

Abreviaturas

ACTINA 2	ACT2
AGAMOUS-LIKE 19	AGL19
AGAMOUS-LIKE 24	AGL24
AGAMOUS-LIKE 42	AGL42
AGAMOUS-LIKE 71	AGL71
AGAMOUS-LIKE 72	AGL72
APETALA 1	AP1
APETALA 2-like	AP2-like
Complejo de silenciamiento inducido por el RNA (<i>RNA-induced silencing complex</i>)	RISC
CONSTANTS	CO
CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1	COP1
ADN complementario (complementary DNA)	cDNA
Día corto	DC
Día largo	DL
FLOWERING LOCUS T	FT
FLOWERING LOCUS C	FLC
FRUITFUL	FUL
GIGANTEA	GI
Giberelinas	GAs
HEXOQUINASA 1	HXK1
Trimetilación de la lisina 27 de la histona 3	H3K27me3
LEAFY	LFY
Meristemo apical aéreo (<i>Shoot Apical Meristem</i>)	SAM
Meristemo de flor	MF
Meristemo de inflorescencia	MI
Micro RNA	miRNA
Micro RNA 156	miR156

Micro RNA 172	miR172
POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2	PRC2
ARN mensajero (messenger RNA)	mRNA
REPRESSOR OF GA1-3	RGA
SCHLAFMÜTZE	SMZ
SCHNARCHZAPFEN	SNZ
SHORT VEGETATIVE PHASE	SVP
SQUAMOSA	SQUA
SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN	SBP
SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 1-16	SPL1-16
SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANTS 1	SOC1
TARGET OF EAT 1-2	TOE1-2
TERMINAL FLOWER 1	TFL1
TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1	TPS1
Trehalosa-6-fosfato	T6P
XAANTAL 1 (AGAMOUS-LIKE 12)	XAL1 (AGL12)
XAANTAL 2 (AGAMOUS-LIKE 14)	XAL2 (AGL14)

Por convención internacional la nomenclatura en *Arabidopsis thaliana* es la siguiente: los nombres de genes y proteínas se escriben con mayúsculas, los primeros con cursivas y los segundos en letra de molde. Los genes mutados van en cursivas y minúsculas. Los mismo se aplica a las abreviaciones de estos.

Resumen

Las plantas atraviesan por tres fases de desarrollo post-embriionario: una etapa vegetativa juvenil, una vegetativa adulta y una reproductiva. Estas etapas y las transiciones entre ellas están determinadas por redes de regulación genética dependientes tanto de señales del desarrollo como por factores ambientales. *Arabidopsis thaliana* es una planta anual que se ha utilizado como organismo modelo para estudiar estas fases del desarrollo.

En angiospermas, el cambio al estado reproductivo del meristemo apical aéreo se conoce como transición a la floración. Este suceso es regulado por una intrincada red de regulación genética, en la cual se ha descrito la participación de diferentes tipos de factores transcripcionales. Los miembros de dos grandes familias génicas, MADS-box y SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), tienen un papel crucial durante esta transición. No obstante, la relación existente entre los factores MADS-box y SPLs no se conoce del todo.

Estudios previos indican la participación de las proteínas con dominio MADS AGAMOUS-like 19 (AGL19), XAANTAL1/AGL12 (XAL1) y XAANTAL2/AGL14 (XAL2) durante la transición a la floración en condiciones específicas de fotoperiodo y temperatura. En este trabajo se analizó la regulación transcripcional entre estos MADS-box y SPL3, SPL5, SPL9 y SPL15, que son los factores SPLs mejor caracterizados como reguladores de la transición a la floración. Esta regulación fue estudiada en dos órganos de plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en un fotoperiodo de día largo, que son condiciones inductivas de la floración.

Los resultados muestran que los factores de transcripción SPLs analizados regulan diferencialmente a los genes *AGL19*, *XAL1* y *XAL2* en hojas y el ápice de las plantas. La

mayoría de los factores SPLs reprimen a estos MADS-box en las hojas, con excepción de SPL3 y SPL9 que inducen a *AGL19*. Así mismo, XAL1 y XAL2, inducen a *SPL9* y reprimen a *SPL5* en las hojas. Finalmente, se identificó que XAL1 induce a todos los *SPLs* en el ápice.

Este trabajo permite iniciar a dilucidar la regulación entre algunos miembros de las familias de factores de transcripción SPL y MADS-box que subyacen la transición a la floración en respuesta al fotoperiodo de día largo. Estos resultados son relevantes dado que ayudarán a entender la integración que existe entre las señales propias del desarrollo y la señalización en respuesta al ambiente, lo que finalmente promueve la floración en el momento adecuado.

1. Introducción

1.1 Transiciones de fase en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*

Los organismos eucariontes pasan por una serie de etapas de desarrollo donde suelen aumentar de tamaño y complejidad. En las plantas con flor, todos los órganos aéreos son generados a partir de un meristemo que se establece desde el desarrollo embrionario, llamado meristemo apical aéreo o SAM (*Shoot Apical Meristem*) (Clark, 1996). Durante el desarrollo, el SAM transita por diferentes fases con perfiles de expresión específicos que son regulados tanto por señales ambientales como endógenas de la planta (Williams y Fletcher, 2005).

Esencialmente, las plantas tienen tres fases de desarrollo: una fase vegetativa juvenil, una fase vegetativa adulta y una fase reproductiva (Poethig, 1990; Poethig, 2013). *Arabidopsis thaliana* (de aquí en adelante *Arabidopsis*), perteneciente a la familia Brassicaceae, es una planta anual que ha sido utilizada como organismo modelo para estudiar estas fases de desarrollo y las transiciones entre ellas. Algunas de las razones por la que es una planta muy estudiada radican en la facilidad para cultivarla en condiciones controladas y que existe un gran número de mutantes en los *Stock Center*, por lo que se pueden hacer ensayos de genética molecular (Meinke *et al.*, 1998; Meyerowitz, 2001). Esto ha ayudado en el conocimiento de las redes genéticas que participan en el desarrollo de las plantas y su plasticidad ante el ambiente.

1.1.1 Fase vegetativa

Después de la germinación la planta incrementa su capacidad fotosintética lo que permite la acumulación de una mayor cantidad de reservas energéticas y, por lo tanto, un aumento en el crecimiento (Huijser y Schmid, 2011; Poethig, 2013). La transición vegetativa o heteroblastía es la transición de la etapa juvenil a la madura y, en *Arabidopsis*, se caracteriza por producir

cambios morfológicos y fisiológicos en las hojas de roseta (Poethig, 1990; Irish y Karlen, 1998; Tsukaya *et al.*, 2000).

Durante el estado vegetativo juvenil, las hojas presentan un mayor número y tamaño de células (Usami *et al.*, 2009), además tienen peciolo largo, la lámina es redondeada con el margen liso y no pueden desarrollar tricomas abaxiales (en el envés de la hoja) (Chien y Sussex, 1996; Telfer *et al.*, 1997; Tsukaya *et al.*, 2000; Usami *et al.*, 2009). Así mismo, en este estado se encuentra reprimida la competencia reproductiva (Poethig, 2003; Poethig, 2013).

En la fase adulta de la planta, las hojas presentan un peciolo más corto, la lámina es más alargada y el margen aserrado. Aunado a ello, se pueden desarrollar los tricomas en ambos lados de las hojas (Chien y Sussex, 1996; Telfer *et al.*, 1997; Tsukaya *et al.*, 2000; Usami *et al.*, 2009). Es en esta fase donde la planta cuenta con las suficientes reservas energéticas para que se pueda dar la transición a la fase reproductiva (Huijser y Schmid, 2011; Poethig, 2013).

Existen reguladores que participan en el desarrollo vegetativo que necesitan ser reprimidos durante las transiciones al estado adulto y reproductivo. Este es el caso de miembros pertenecientes a la familia APETALA2-like (AP2-like), como TARGET OF EAT 1 (TOE1), TOE2, SCHNARCHZAPFEN (SNZ) y SCHLAFMÜTZE (SMZ), que actúan como represores de las transiciones de fase del desarrollo. Entre sus blancos, se encuentra *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009), el cual es importante durante la promoción de la transición al estado reproductivo, cuya función se describirá más adelante.

Se han detectado los mRNAs de *TOE1* y *SNZ* en hojas a lo largo del desarrollo vegetativo sugiriendo una función en estos órganos (Aukerman y Sakai, 2003; Jung *et al.*,

2007; Mathieu *et al.*, 2009). En estudios en plantas mutantes de pérdida de función de *TOE1* y *TOE2* crecidas en un fotoperiodo de día corto (DC), en este caso, correspondiente a 10 horas de luz por 14 horas de obscuridad, se observó una aceleración en la producción de tricomas abaxiales; por el contrario, en líneas sobreexpresoras de estos mismos genes se retrasó su producción (Wu *et al.*, 2009). Por lo tanto, además de su función represora de la transición a la fase reproductiva, estas proteínas AP2-like actúan como represoras de la transición vegetativa, por lo que evitan que se adquieran las características adultas en la epidermis de la hoja antes de tiempo (Wu *et al.*, 2009).

Para que puedan llevarse a cabo las transiciones de fase, se requiere la degradación de los transcritos de *TOE1*, *TOE2*, *SNZ* y *SMZ* mediante la inducción del microRNA *miR172* (Aukerman y Sakai, 2003; Schmid *et al.*, 2003; Schwab *et al.*, 2005; Mathieu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Para que los miRNAs lleven a cabo su actividad de silenciamiento, el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) se une a los mRNAs blancos, mediante la complementariedad con la cadena del miRNA asociado, y silencia sus blancos por escisión o represión traduccional, ya que impide que los mRNAs blancos sean traducidos (Bartel, 2004; Xu *et al.*, 2016; He, 2017).

La expresión de *miR172* incrementa gradualmente con la edad de la planta, de forma inversa a la expresión de *miR156*, cuya expresión disminuye con la edad (figura 1; Aukerman y Sakai, 2003; Wu y Poethig, 2006; Jung *et al.*, 2007). *miR156* es un represor post-transcripcional de los genes *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*, ya que promueve la degradación de sus mRNAs. Por lo tanto, cuando este miRNA disminuye, la acumulación de los mensajeros de la mayoría de los *SPLs* se incrementa. Los factores *SPLs* a su vez, inducen la transcripción de los precursores de *miR172*, que reprime la acumulación de represores de la floración (Jung *et al.*, 2011).

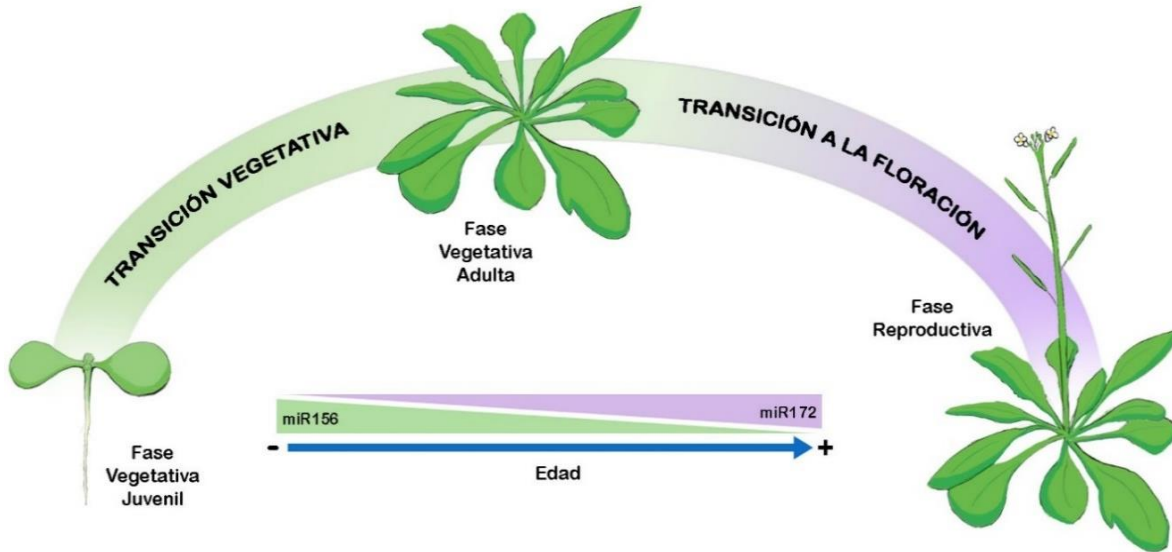


Figura 1. Transiciones de fase en el desarrollo de Arabidopsis. Durante su ciclo de vida las plantas pasan por tres fases de desarrollo, una fase vegetativa juvenil, una vegetativa adulta y una reproductiva. La regulación de las transiciones entre estas fases que se da por dos microRNAs es muy relevante. *miR156* (verde) reprime a promotores de las transiciones de fase, se acumula en etapas tempranas del desarrollo y esta acumulación disminuye con la edad de la planta. Por otra parte, *miR172* (morado) tiene un patrón de expresión opuesto, en el que incrementa su expresión con la edad y promueve las transiciones de fase reproductiva al reprimir a los represores de ésta.

Por otra parte, FLOWERING LOCUS C (FLC), un factor transcripcional de la familia MADS-box, participa durante el desarrollo vegetativo y también actúa como represor de la transición al estado reproductivo (Michaels y Amasino, 1999; Helliwell *et al.*, 2006). Plantas mutantes en este MADS-box crecidas en día largo (DL), que experimentalmente corresponde a 16 horas de luz por 8 horas de obscuridad, presentan menor cantidad de hojas intermedias, que son aquellas que muestran características transitorias entre el estado juvenil y el adulto, respecto a plantas que tienen este gen activo (Willmann y Poethig, 2011). Cabe destacar que este fenotipo puede deberse a que FLC es capaz de reprimir directamente a *SPL15* y activar a miembros de la familia AP2-like (Deng *et al.*, 2011).

Dentro de las señales endógenas de la planta que regulan las transiciones de fase del desarrollo, está el papel de algunos carbohidratos como moléculas señalizadoras para que se lleven a cabo dichas transiciones, como la trehalosa-6-fosfato (T6P). Las plantas mutantes en el gen de la *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS1)* crecidas en DL, tienen un retraso en ambas transiciones de fase del desarrollo, mismo que se complementa si se induce la expresión de TPS1, indicando que la T6P induce estos procesos (van Dijken *et al.*, 2004; Ponnu *et al.*, 2020). La señalización dada por la T6P interacciona con la señalización del módulo *miR156-SPL* promoviendo la disminución de la expresión de *miR156* y la consiguiente acumulación de los *SPL* (Ponnu *et al.*, 2020). Adicionalmente, la represión de *miR156* también es mediada por la concentración de CO₂ y otros carbohidratos como la glucosa (May *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013). No se conoce con exactitud el mecanismo en el que la glucosa reprime la acumulación de *miR156*, pero una posibilidad es que podría ser mediada parcialmente por la señalización de la HEXOQUINASA 1 (HXK1) (Yang *et al.*, 2013). La HXK1 cataliza la primera reacción de la glucólisis y actúa como un sensor de azúcares que en un complejo nuclear puede regular directamente la expresión genética como respuesta a cambios en la concentración de glucosa (Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006).

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas reguladoras del crecimiento que se ha visto participan de distintas formas durante las transiciones de fase del desarrollo (Telfer *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2012). En la transición vegetativa, plantas mutantes deficientes en esta fitohormona presentan un retraso en la producción de tricomas abaxiales, incluso al crecerlas en luz constante (Chien y Sussex, 1996). Por el contrario, plantas en las que se les aplican GAs exógenas se acelera su producción (Telfer *et al.*, 1997). Se sabe que algunos SPLs interaccionan con las proteínas DELLA, reguladores negativos de la señalización por GAs,

para poder llevar a cabo su regulación transcripcional, lo que indicaría que la interacción de los factores de transcripción SPLs con las DELLAs puede mantener la fase vegetativa, cuando no hay una alta concentración de GAs (Yamaguchi *et al.*, 2014; Hyun *et al.*, 2016).

Una vez que la planta ha alcanzado un estado adulto, tiene la capacidad de captar e integrar las señales inductivas para dar paso a la transición al estado reproductivo, a lo que en angiospermas se conoce como *transición a la floración* (Poethig, 2003; Poethig, 2013).

1.1.2 Transición a la floración

La transición del estado vegetativo al estado reproductivo es un proceso fundamental en el ciclo de vida de las plantas (García Ponce de León *et al.*, 2020). En *Arabidopsis* esta transición involucra la transformación del SAM, el cual cesa de producir hojas de roseta y se transforma en un meristemo de inflorescencia (MI) a partir del cual crece el tallo principal. El MI, localizado en el ápice, da origen a los meristemos de flor (MF) que posteriormente se diferenciarán en los órganos florales (Schultz y Haughn, 1993; Bradley *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2009). Esta transición es precedida por la capacidad de la planta para responder a estímulos que inducen el desarrollo reproductivo y culmina en la producción de semillas después de la fertilización, por lo que el momento en el que sucede este evento tiene un impacto en la adecuación de la descendencia (Simpson y Dean, 2002; Poethig, 2013).

Una gran cantidad de genes han sido caracterizados como reguladores de la transición a la floración, gracias a múltiples análisis genéticos y moleculares que utilizan mutantes de pérdida de función y líneas sobreexpresoras crecidas bajo diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, muchos de estos genes, no son exclusivos de la transición a la floración y participan en otros procesos del desarrollo (Rédei, 1962; Koornneef, 1991; Amasino, 2010; Fornara *et al.*, 2010; Srikanth y Schmid, 2011). Se han descrito siete vías

genéticas: la del fotoperiodo, la vernalización, la vía autónoma, la vía de las GAs, la vía de la trehalosa, la vía sensible a la temperatura y la vía que responde al envejecimiento o la edad de la planta (figura 2; Amasino, 2010; Fornara *et al.*, 2010; Srikanth y Schmid, 2011; Wahl *et al.*, 2013). Aunque estas vías se han estudiado de forma independiente también interaccionan entre ellas y en conjunto forman una red genética compleja que coordina las condiciones ambientales de crecimiento con las señales fisiológicas y propias del desarrollo, permitiendo maximizar la eficiencia de la transición al estado reproductivo (Fornara *et al.*, 2010; Srikanth y Schmid, 2011; Wellmer y Riechmann, 2010). De manera interesante, esta red genética converge en dos genes que codifican para los factores de transcripción: LEAFY (LFY), único para el reino *Plantae*, y APETALA1 (AP1), que es un factor tipo MADS-box. Estas dos proteínas en cooperación con CAULIFLOWER (CAL) son fundamentales, para darle la identidad a los MF (figura 2; Weigel *et al.*, 1992; Ferrándiz *et al.*, 2000; Wellmer y Riechmann, 2010).

El fotoperiodo de DL es uno de los estímulos que participan en la transición a la floración más estudiados (Imaizumi y Kay, 2006; Amasino, 2010; Fornara *et al.*, 2010; Srikanth y Schmid, 2011). *Arabidopsis* es una planta cuya transición a la floración se promueve por la exposición a días largos (verano) y es reprimida por días cortos (invierno), en las zonas donde se distribuye naturalmente (Fornara *et al.*, 2010). La detección del fotoperiodo de DL se da en las hojas y hay tres genes que tienen un papel fundamental en esta señalización para que se pueda dar la inducción de la floración: *GIGANTEA* (*GI*), *CONSTANTS* (*CO*) y *FT*. Inicialmente, la captación de la luz se da por fotorreceptores que se activan en respuesta a la luz, los cuales sincronizan la actividad del ciclo circadiano (Shim *et al.*, 2017). *GI* es un gen de regulación circadiana, que durante la fase lumínica su proteína

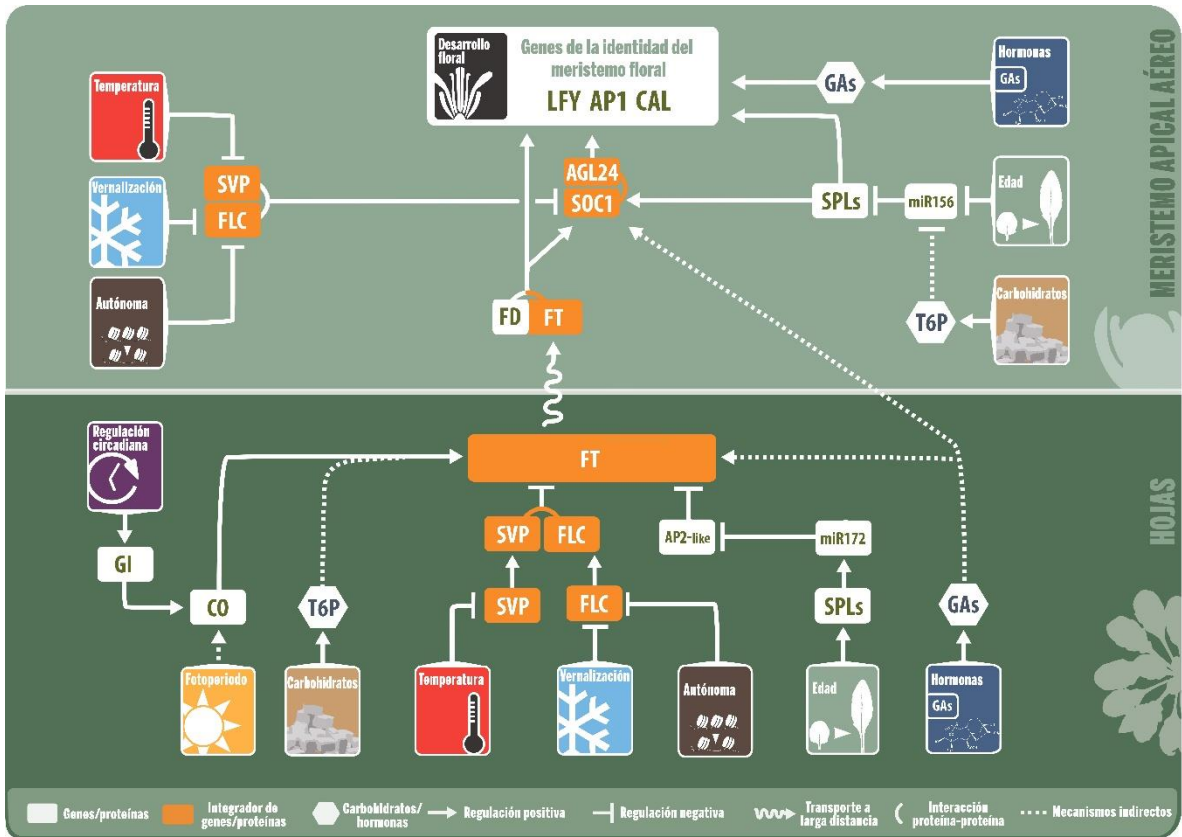


Figura 2. Red de regulación de la transición a la floración. Tradicionalmente se han descrito 7 “vías genéticas” de transición a la floración: la del fotoperiodo, la vernalización, la vía autónoma, la vía de las GAs, la vía de la trehalosa, la vía sensible a la temperatura y la vía que responde al envejecimiento y la edad de la planta, que confluyen en la expresión de *LFY* y *API*, que en cooperación con *CAL* le dan la identidad a los MF (Modificado de Bouché et al., 2016).

interacciona con FLAVIN KELCH F BOX 1 (FKF1), el cuál es un fotorreceptor con actividad ubiquitín-ligasa, que media la degradación de CYCLING DOF FACTORS (CDFs), que son represores transcripcionales de *CO*. Por otra parte, GI también es capaz de inducir directamente la expresión de *CO* (Sawa et al., 2007; Fornara et al., 2009). Durante el fotoperiodo de DL, la proteína de *CO* logra acumularse mientras que, en el fotoperiodo de DC, que en general corresponde a 8 horas de luz por 16 horas de obscuridad, es ubiquitinada en la obscuridad por CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1), lo que promueve su degradación. Por lo tanto, *CO* puede inducir la transcripción de *FT* sólo en DL,

el cual se transcribe y traduce en las hojas (An *et al.*, 2004; Notaguchi *et al.*, 2008). FT, es una proteína similar a las proteínas de mamíferos inhibidoras de RAF-cinasas (RKIP), que viaja vía el floema al MI, donde se une con el factor de transcripción FD (Kobayashi *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 2005; Jaeger y Wigge, 2007; Jang *et al.*, 2008). El dímero FT-FD a su vez, desencadena el inicio del programa de desarrollo floral induciendo la transcripción de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* que es translocado al núcleo por AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24), ambos MADS-box, induciendo directamente a los genes de la identidad del meristemo floral *LFY* y *API* (figura 2; Yoo *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008).

Además de la regulación por el fotoperiodo de DL. Se ha encontrado que la exposición a un periodo prolongado a bajas temperaturas o vernalización promueve la floración una vez que la temperatura aumenta nuevamente (Chouard, 1960). En *Arabidopsis* esta respuesta se debe al silenciamiento de *FLC*, el cual reprime directamente a *SOC1* y *FT* que, como se mencionó, son inductores de *LFY* y *API*, inhibiendo así la floración (Michaels y Amasino, 1999; Michaels *et al.*, 2005; Helliwell *et al.*, 2006).

El silenciamiento de *FLC* es regulado por marcas epigenéticas, como la H3K27me3 que es catalizada por el complejo POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2). Esta marca se acumula inicialmente en la región de la nucleación entre el primer exón e intrón de *FLC* en respuesta a vernalización y se esparce a todo lo largo del gen al regresar a temperaturas óptimas (De Lucia *et al.*, 2008).

Durante el desarrollo vegetativo la represión de *FT* y *SOC1* por *FLC* evita una transición a la floración prematura y una vez que la planta es apta, *FLC* tiene que ser reprimido para que se pueda transitar al estado reproductivo. La “vía” autónoma regula la inactivación de *FLC* por varios mecanismos como el procesamiento de su mRNA o la

modificación de la cromatina sin que se requiera de vernalizar a las plantas (Cheng *et al.*, 2017).

Arabidopsis florece cuando está expuesta a temperaturas entre 22-27°C aproximadamente, pero a temperaturas más bajas, como 16°C, se retarda su floración (Blázquez *et al.*, 2003). El factor de transcripción MADS-box SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) junto con FLC, reprimen a *FT* en condiciones de baja temperatura y por lo tanto la floración (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Al aumentar la temperatura, FLC es degradado lo que permite que, junto con la señal dada por el fotoperiodo de DL, aumente la expresión de *FT* (Blázquez *et al.*, 2003).

De la misma manera que en la transición vegetativa, la pérdida de la TPS1 causa un severo retraso en la floración de *Arabidopsis* (van Dijken *et al.*, 2004), así como una disminución en la expresión de algunos factores *SPLs* en el MI. Esta regulación es parcialmente independiente de la señalización por *miR156*, indicando que la T6P es importante para la transición a la floración (Wahl *et al.*, 2013; Ponnu *et al.*, 2020). La T6P induce además a *FT* en las hojas, pero todavía se desconoce el mecanismo por el que se lleva a cabo dicha regulación (Wahl *et al.*, 2013).

En DL, las GAs actúan en paralelo a CO para inducir la transcripción de *FT* (Hisamatsu y King, 2008). Sin embargo, en condiciones no inductivas de DC, las plantas con mutaciones que afectan la biosíntesis de GAs o que incrementan su degradación, a veces son incapaces de florecer (Wilson *et al.*, 1992). Se ha demostrado que las GAs inducen la transcripción de *SOCl* y *LFY* y también inducen la de *AGL24* (Blázquez *et al.*, 1998; Moon *et al.*, 2003; Srikanth y Schmid, 2011). No obstante, aún se desconocen otros posibles blancos de estas hormonas. Por ejemplo, el mutante *xal2-2* (otro MADS-box, ver más adelante), presenta un retraso considerable en la floración al crecer las plantas en DC y tratarlas con

GAs exógenas. Además, el doble mutante *xal2-2 soc1-6* bajo las mismas condiciones es incapaz de florecer, lo que sugiere que XAL2 y SOC1 participan aditivamente en respuesta a esta hormona durante la transición a la floración (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015).

La edad es otro de los estímulos que promueven la transición a la floración. Para fines de este trabajo ahondaré en la descripción de los factores transcripcionales SPLs, que participan a lo largo del ciclo de vida de las plantas y tienen un papel fundamental en la regulación de ambas transiciones de fase del desarrollo en respuesta a la edad o el envejecimiento (Wu y Poethig, 2006; Schwarz *et al.*, 2008).

1.2 Factores de transcripción SPLs

Los genes que contienen un SQUAMOSA PROMOTER BINDING-box (SBP-box) codifican para factores de transcripción que se encuentran en todo el reino vegetal. El dominio SBP, de aproximadamente 76 aminoácidos, está conservado y es responsable tanto de la translocación de la proteína al núcleo, como de la unión al DNA. Las primeras proteínas de la familia que fueron identificadas, SBP1 y SBP2, son capaces de unirse al gen de la identidad del meristemo floral *SQUAMOSA (SQUA)*, el ortólogo de *API* en *Antirrhinum majus* (Klein *et al.*, 1996), por lo que en *Arabidopsis* se les dio el nombre de *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*.

En *Arabidopsis* esta familia de genes comprende 16 miembros que se dividen en dos grandes grupos de acuerdo con el tamaño de su secuencia (Xing *et al.*, 2010). El grupo I abarca los *SPL* más grandes cuya estructura presenta 10 o más exones que codifican para proteínas de más de 800 aminoácidos. Por otra parte, los miembros del grupo II presentan entre dos y cuatro exones, lo que resulta en proteínas de alrededor de 400 aminoácidos, con excepción de SPL3, SPL4 y SPL5, cuyas proteínas tienen menos de 200 aminoácidos

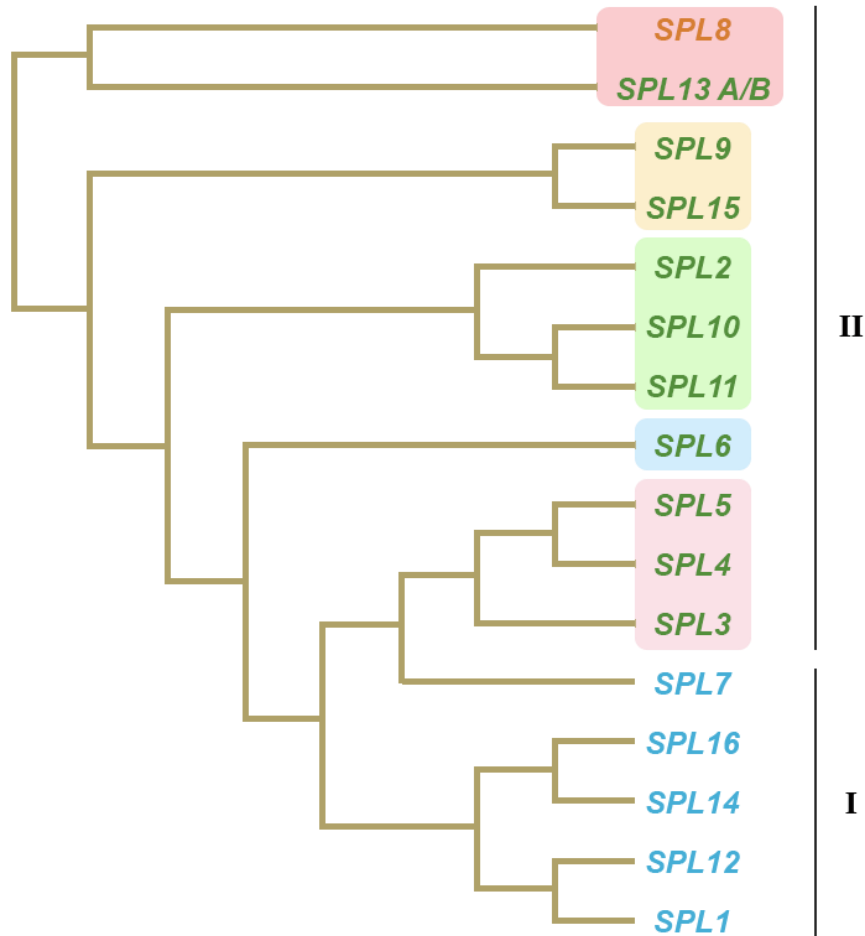


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre todos los SPL de Arabidopsis. Se señalan los dos grupos (I y II) en que se divide la familia de acuerdo con el tamaño de su secuencia, y en colores se resaltan los clados en que se subdivide el grupo II. Con letra verde se muestran los SPL blancos de *miR156* (Preston y Hileman, 2013).

(Cardon *et al.*, 1999; Xing *et al.*, 2010). Adicionalmente, los genes del grupo II pueden ser agrupados en 5 clados con base en la secuencia que codifica para el dominio SBP: *SPL3/SPL4/SPL5*, *SPL2/SPL10/SPL11*, *SPL8/SPL13A/B*, *SPL6* y *SPL9/SPL15* (figura 3; Preston y Hileman, 2013; Xu *et al.*, 2016).

De los 11 miembros del grupo II, 10 son regulados post-transcripcionalmente por *miR156* (figura 3; Cardon *et al.*, 1999; Wu y Poethig, 2006; Xu *et al.*, 2016), por lo que en etapas tempranas del desarrollo los *SPLs* se acumulan muy poco y la disminución de la

expresión de este miRNA con la edad de la planta conlleva a un aumento en la expresión de estos factores de transcripción (Wu y Poethig, 2006; Xu *et al.*, 2016).

Debido a que es una familia altamente redundante, el análisis de la función individual de cada SPL se dificulta. Por lo que, utilizando líneas que sobreexpresan versiones resistentes a *miR156* de *SPL2*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13A/B*, y *SPL15* se ha podido establecer su participación en procesos de desarrollo en toda la planta, desde la raíz hasta las transiciones del SAM (Wang *et al.*, 2008; Usami *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Gou *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2012; Stief *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2019). Por otro lado, la función de *SPL3*, *SPL4* y *SPL5* (*SPL3/4/5*) parece ser preponderante en la promoción de la transición a la floración y en la formación de los MF (Yamaguchi *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016).

1.2.1 Regulación de la transición vegetativa mediada por los SPLs

Se ha caracterizado a *SPL9/SPL15* como uno de los principales clados de SPLs que controlan ambas transiciones de fase del desarrollo en *Arabidopsis*. Sin embargo, cuando se crecen plantas triples mutantes *sp19/13/15* se incrementa la cantidad de hojas juveniles en ambos fotoperiodos, sugiriendo que *SPL13* también tiene un papel importante durante la transición vegetativa (Xu *et al.*, 2016). Hasta ahora se sabe que el mecanismo principal por el que los factores SPLs promueven esta transición es mediante la inducción del precursor de *miR172*, papel que llevan a cabo *SPL9*, *SPL10* y *SPL15* (figura 4; Wu *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2016). Además, se han analizado distintas líneas de plantas transgénicas, una que expresa un represor quimérico de *SPL10* (*35S:SPL10SRDX*), así como una que sobreexpresa una versión resistente a *miR156* de este mismo SPL (*35S:mSPL10*), ambas crecidas en DL (Shikata *et al.*, 2009). Ambas líneas presentan alteraciones en la morfología de las hojas, pero no así en la

producción de tricomas abaxiales, sugiriendo que SPL10 participa parcialmente en la adquisición de las características adultas durante la transición vegetativa (Shikata *et al.*, 2009).

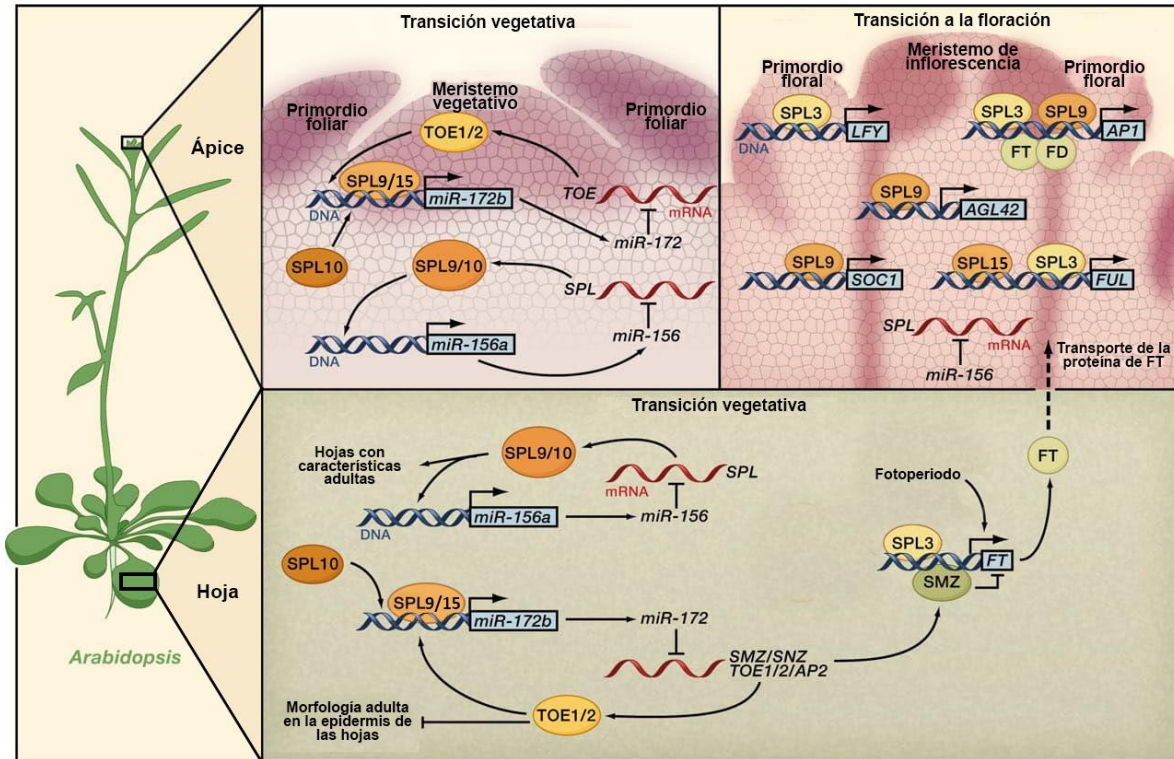


Figura 4. Participación de los SPLs durante las transiciones de fase del desarrollo. La promoción de la transición vegetativa se debe a la disminución de la acumulación de *miR156* y la consecuente acumulación de algunos *SPLs* tanto en las hojas (parte inferior) como en el meristemo (superior izquierda), SPL9, SPL10 y SPL15 inducen a *miR172* quien a su vez reprime a los *AP2-like* permitiendo la adquisición de las características adultas en las hojas y la competencia reproductiva en el meristemo. Por su parte, durante la transición a la floración, en las hojas el módulo *SPL-miR172* libera de la represión a *FT*, quien a su vez es activado por SPL3, permitiendo que se desencadene la señalización por fotoperiodo de DL. En el meristemo (superior derecha), SPL3, SPL9 y SPL15, en paralelo a la regulación por el módulo FT-FD, regulan positivamente a genes esenciales para florecer como *SOC1*, *AGL42* y *FRUITFUL (FUL)* y a genes de la identidad del MF como *LFY* y *API* (Modificado de Fornara y Coupland, 2009).

Adicionalmente, la participación de *SPL3/4/5* durante esta transición aún no es clara. Los mutantes sencillos de estos *SPLs*, e incluso el triple mutante *spl3/4/5*, no presentan un fenotipo vegetativo evidente. Pero se sabe que las plantas que sobreexpresan una versión resistente a *miR156* de *SPL3/4/5* crecidas en DC tienen fenotipos parecidos a los mutantes *toe1* y *toe2* o a plantas sobreexpresoras de *miR172*. Es decir, se acelera la producción de tricomas abaxiales, pero contrario a lo esperado, no tienen un aumento en la acumulación de *miR172*, ni tampoco disminuye la acumulación de *TOE1* y *TOE2*. Tomando en cuenta estos datos, se ha propuesto que, *SPL3/4/5* promueven la transición vegetativa por una vía independiente a *miR172* y los genes *AP2-like* (Wu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016).

1.2.2 Los factores SPLs en la transición a la floración

Los clados que incluyen a *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* son los que se han caracterizado principalmente como promotores de la floración en *Arabidopsis*. Aunque recientemente, se ha identificado que los miembros de otro clado, *SPL2*, *SPL10*, y *SPL11* también pueden promover esta transición (Yao *et al.*, 2019).

El incremento de la expresión de los *SPLs*, particularmente *SPL9*, *SPL10* y *SPL15*, en las células acompañantes del floema en las hojas promueve la floración mediante la inducción de *miR172*, que evita la acumulación de los *AP2-like* permitiendo la activación de *FT* por CO (figura 4; Wu *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2016). Recientemente, también se ha encontrado que *SPL3/4/5* pueden promover la floración al unirse e inducir la expresión del gen *MIR172C* como respuesta a cambios en la calidad de la luz (Xie *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha descrito que sobreexpresando a *SPL3*, este es capaz de unirse e inducir la transcripción de *FT* en DL. Esta regulación cobra particular relevancia cuando las plantas son crecidas a bajas temperaturas como 16°C (Kim *et al.*, 2012), y, además *SPL3* también

puede unirse a *LFY* en el meristemo de flor incipiente en ambos fotoperiodos (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Algunos factores SPLs como SPL3, SPL4, SPL5, SPL9 y SPL15 llevan a cabo su función transcripcional directa o indirectamente con el aumento de la concentración de GAs al momento de la transición a la floración (Jung *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Hyun *et al.*, 2016). Para ello, las GAs envían a degradación a las proteínas DELLA, lo que permite que los SPLs queden libres para inducir a sus blancos durante la floración (Yu *et al.*, 2012; Hyun *et al.*, 2016). Sin embargo, también se ha visto que cuando SPL9 interacciona con la DELLA, REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) puede inducir la transcripción de *API* en DL y su función es reprimida en presencia de las GAs (Yamaguchi *et al.*, 2014).

1.3 Factores de transcripción MADS-box como reguladores del desarrollo en plantas

La familia de factores de transcripción MADS-box tienen funciones relevantes en diferentes procesos de desarrollo y está altamente conservada en todos los organismos eucariontes. Todos sus miembros comparten un dominio de unión a DNA de aproximadamente 60 aminoácidos conocido como dominio MADS, acrónimo derivado de la primera proteína encontrada con este dominio en distintos eucariontes: Minichromosome maintenance 1 (MCM1) de *Saccharomyces cerevisiae*, AGAMOUS (AG) de *Arabidopsis thaliana*, DEFICIENS (DEF) de *Antirrhinum majus* y el factor de respuesta al suero (SRF) de *Homo sapiens* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2011; Smaczniak *et al.*, 2012).

Esta familia se divide en dos grandes linajes, los MADS-box del Tipo I y los del Tipo II, siendo estos últimos los mejor caracterizados y en los cuales se enfocó este trabajo. Los MADS-box Tipo II de plantas tienen una estructura modular que se denomina MIKC; la cual tiene en el extremo N-terminal el dominio MADS de unión a secuencias específicas del DNA

(cajas CArG); seguido de las regiones **Intermedia** y **Keratin-like** que son esenciales para la dimerización y la formación de complejos proteicos y finalmente el extremo **Carboxilo** terminal el cual es una región variable que puede ayudar en la dimerización y en la regulación transcripcional (Kaufmann *et al.*, 2005).

En plantas existen más de 100 MADS-box (Alvarez-Buylla *et al.*, 2011; Smaczniak *et al.*, 2012), de los cuales se sabe que: AGL65, AGL66, AGL104, SHATTERPROOF 1 (SHP1), SHP2 y SEEDSTICK (STK) tienen funciones importantes durante la gametogénesis (Pinyopich *et al.*, 2003; Adamczyk y Fernandez, 2009; Smaczniak *et al.*, 2012); AGL15 participa en el desarrollo embrionario (Heck *et al.*, 1995; Harding *et al.*, 2003); ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1 (ANR1) participa en el desarrollo de la raíz primaria (Gan *et al.*, 2005; Moreno-Risueno *et al.*, 2010; Gan *et al.*, 2012; Alvarez-Buylla *et al.*, 2019), al igual que XAANTAL1 (XAL1) y XAL2, que además de estar implicados en proliferación celular del meristemo apical de este órgano, también participan en la regulación de las hormonas auxinas (Tapia-López *et al.*, 2008; Garay-Arroyo *et al.*, 2013; García-Cruz *et al.*, 2016; Alvarez-Buylla *et al.*, 2019); AGL21, SOC1, FLC y SVP además de participar en la floración, responden a estrés abiótico (Chiang *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2009; Riboni *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Castelán-Muñoz *et al.*, 2019).

Así mismo, muchos de los factores MADS-box que se han caracterizado pueden participar como activadores o represores de la transición a la floración, en la identidad del MF y en la especificación de los órganos florales, como se describe en la tabla I.

Debido a que tanto los MADS-box como los SPL son familias de factores transcripcionales relacionados con el desarrollo y las transiciones de fase del SAM, se ha empezado a estudiar la forma en que interaccionan entre sí.

Tabla I. Proteínas MICK que actúan como reguladores de la floración y el desarrollo floral en Arabidopsis. (Modificado de Smaczniak *et al.*, 2012)

Proteína	Símbolo	Función	Referencia
AGAMOUS	AG	Especificación de estambres y carpelos	Yanofsky <i>et al.</i> , 1990
AGAMOUS-LIKE 6	AGL6	Activador de la floración	Koo <i>et al.</i> , 2010; Yoo <i>et al.</i> , 2011
AGAMOUS-LIKE 15	AGL15	Represor de la floración	Adamczyk <i>et al.</i> , 2007
AGAMOUS-LIKE 16	AGL16	Represor de la floración	Hu <i>et al.</i> , 2014
AGAMOUS-LIKE 17	AGL17	Activador de la floración	Han <i>et al.</i> , 2008
AGAMOUS-LIKE 18	AGL18	Represor de la floración	Adamczyk <i>et al.</i> , 2007
AGAMOUS-LIKE 19	AGL19	Activador de la floración	Schönrock <i>et al.</i> , 2006
AGAMOUS-LIKE 24	AGL24	Activador de la floración	Michaels <i>et al.</i> , 2003
AGAMOUS-LIKE 28	AGL28	Activador de la floración	Yoo <i>et al.</i> , 2006
AGAMOUS-LIKE 42	AGL42	Activador de la floración	Dorca-Fornell <i>et al.</i> , 2011
AGAMOUS-LIKE 71	AGL71	Activador de la floración	Dorca-Fornell <i>et al.</i> , 2011
AGAMOUS-LIKE 72	AGL72	Activador de la floración	Dorca-Fornell <i>et al.</i> , 2011
APETALA 1	AP1	Identidad del MF	Ferrándiz <i>et al.</i> , 2000
APETALA 3	AP3	Especificación de pétalos y estambres	Jack <i>et al.</i> , 1992
CAULIFLOWER	CAL	Identidad del MF	Ferrándiz <i>et al.</i> , 2000
FLOWERING LOCUS C	FLC	Represor de la floración	Michaels y Amasino, 1999
FRUITFULL	FUL	Floración y desarrollo del fruto	Torti y Fornara, 2012
MADS AFFECTING FLOWERING 1-4	MAF1-4	Represores de la floración	Ratcliffe <i>et al.</i> , 2001; Ratcliffe <i>et al.</i> , 2003
MADS AFFECTING FLOWERING 5	MAF5	Activador de la floración	Ratcliffe <i>et al.</i> , 2003
PISTILLATA	PI	Especificación de pétalos y estambres	Goto y Meyerowitz, 1994
SEPALLATA 1-4	SEP1-4	Especificación de los cuatro verticilos florales	Mandel y Yanofsky, 1998; Pelaz <i>et al.</i> , 2000; Ditta <i>et al.</i> , 2004
SHORT VEGETATIVE PHASE	SVP	Represor de la floración	Hartmann <i>et al.</i> , 2000
SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1	SOC1	Activador de la floración	Lee <i>et al.</i> , 2000
XAANTAL 1	XAL1/AGL12	Activador de la floración	Tapia-López <i>et al.</i> , 2008
XAANTAL 2	XAL2/AGL14	Activador de la floración	Pérez-Ruiz <i>et al.</i> , 2015

1.4 Regulación transcripcional entre algunos MADS-box y SPLs durante la transición a la floración

Los factores de transcripción de la familia SPL participan en la regulación de la transición a la floración al inducir a *LFY* y *API* de forma directa (Wang *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2020), o pueden hacerlo indirectamente al regular a otros MADS-box.

En el MI, SPL3, SPL9 y SPL15 inducen la expresión de los reguladores positivos de la floración *SOC1* y *FUL* (figura 4 y 5; Wang *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Hyun *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2020). SPL9 también puede activar a uno de los homólogos de *SOC1*, *AGL42* (figura 4; Wang *et al.*, 2009), el cual también es promotor de la floración (Dorca-Fornell *et al.*, 2011).

Los factores de transcripción de tipo SBP-box reconocen las cajas GTAC presentes en las regiones promotoras de sus genes blanco (Birkenbihl *et al.*, 2005). SPL3, SPL9 y SPL15 se unen directamente al promotor o al primer intrón de *SOC1*, *FUL* y *API* promoviendo su transcripción (figura 5; Wang *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2014; Hyun *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2020). Además, SPL4 y SPL5 pueden tener un papel redundante con el de SPL3 al activar a genes de la identidad del MF, ya que al igual que la versión sobreexpresora y resistente a *miR156* de *SPL3* (*35S:SPL3Δ*), las líneas *35S:SPL4Δ* y *35S:SPL5Δ*, crecidas en DL, tienen incrementada la acumulación de los transcritos de *FUL* y *API* (Yamaguchi *et al.*, 2009).

Por otra parte, no se conoce mucho sobre los MADS-box como reguladores de *SPLs*. Hasta ahora sabemos que *SOC1* es capaz de actuar de manera independiente a la regulación por *miR156*. Ya que puede inducir la transcripción de *SPL3/4/5* durante la transición a la floración en respuesta al fotoperiodo de DL o a la señalización por GAs en DC (Jung *et al.*, 2012).

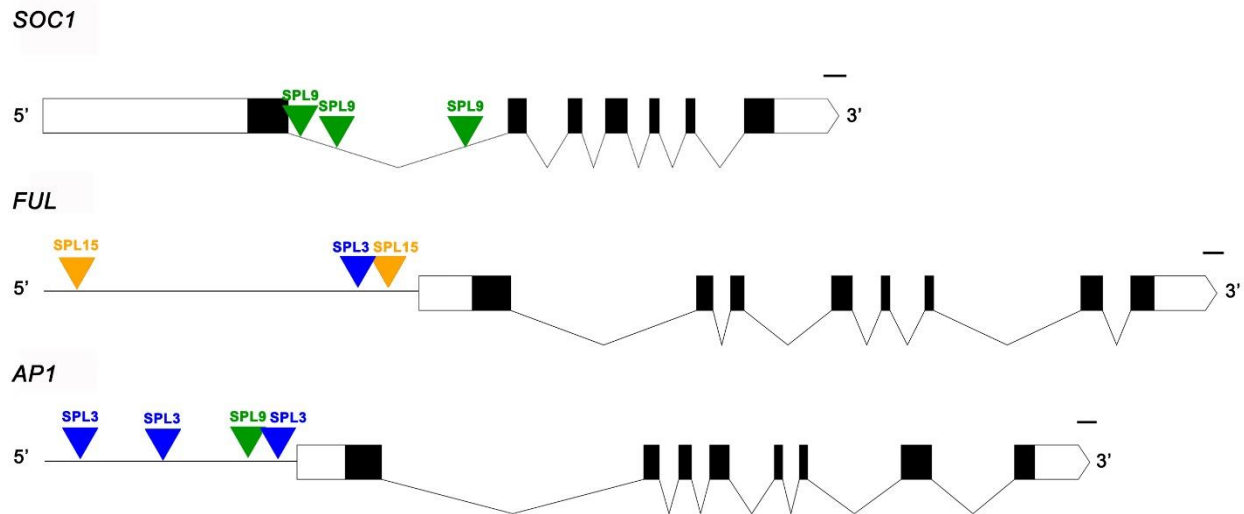


Figura 5. MADS-box como blancos directos de algunos SPL. Representación esquemática de las regiones genómicas de *SOC1*, *FUL*, y *AP1*. Con cajas negras están representados los exones, con cajas blancas las regiones no traducidas o UTR (*Untranslated regions*), con líneas los intrones y con líneas rectas el promotor. Los triángulos indican las regiones promotoras con cajas GTAC donde se unen SPL3 (azul), SPL9 (verde) y SPL15 (naranja). La escala corresponde a 100 pb en los tres genes (Wang *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2014; Hyun *et al.*, 2016; Secuencias obtenidas del TAIR. Disponible en www.arabidopsis.org; Esquemas realizados en: Bhatla, Nikhil. 2012. Exon-Intron Graphic Maker. Disponible en <http://wormweb.org/exonintron>).

2. Antecedentes

En el laboratorio de Genética molecular, epigenética, desarrollo y evolución de plantas, del Instituto de Ecología, UNAM, se han estudiado algunos genes MADS-box como *AGL19*, *XAL1* (Tapia-López *et al.*, 2008) y *XAL2* (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015) que, entre otras funciones, se ha demostrado su participación en la transición a la floración en respuesta a diferentes señales.

AGL19, que originalmente se consideraba un gen exclusivo de las raíces (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Schönrock *et al.*, 2006), se sabe que participa como inductor de la

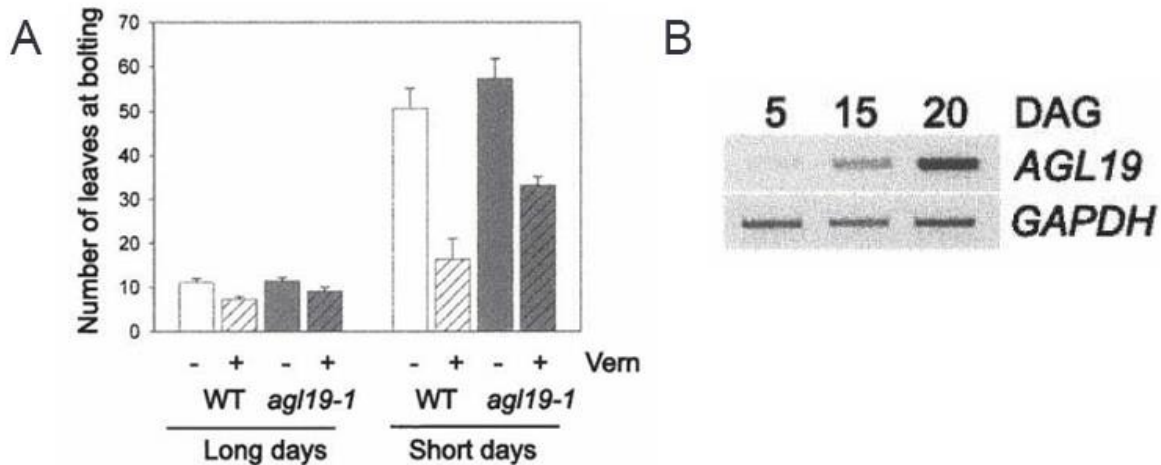


Figura 6. *AGL19* como promotor de la transición a la floración en respuesta a vernalización y patrón de acumulación de su mensajero en DC. (A) Fenotipo de floración tardía del mutante *agl19-1* en plantas vernalizadas y crecidas en DC, pero no en DL. El signo + representa a las plantas vernalizadas, mientras que – a las no vernalizadas. **(B)** La expresión de *AGL19* incrementa con la edad en plántulas crecidas en DC a diferentes días después de la germinación (*Days After Germination*, DAG). La acumulación de *GAPDH* fue utilizada como control constitutivo (Schönrock *et al.*, 2006).

floración después de vernalizar las plantas, ya que dos alelos mutantes crecidos en DC después de un tratamiento con vernalización presentan un fenotipo de floración tardía respecto a las plantas silvestres (Schönrock *et al.*, 2006). Sin embargo, en DL los alelos mutantes de *AGL19* presentan un fenotipo igual al de las plantas silvestres. No obstante, la sobreexpresión de *AGL19* es suficiente para acelerar la floración en ambos fotoperiodos (Schönrock *et al.*, 2006). En la figura 6A, se muestra que el mutante *agl19-1* tiene un mayor número de hojas de roseta que las plantas silvestres en DC. En *Arabidopsis*, el número de hojas de roseta es un parámetro utilizado para determinar el momento en que ocurre la floración ya que, al transitar al estado reproductivo, el SAM deja de producir hojas de roseta. Así mismo, es interesante que el nivel de acumulación del mensajero de *AGL19* se incrementa

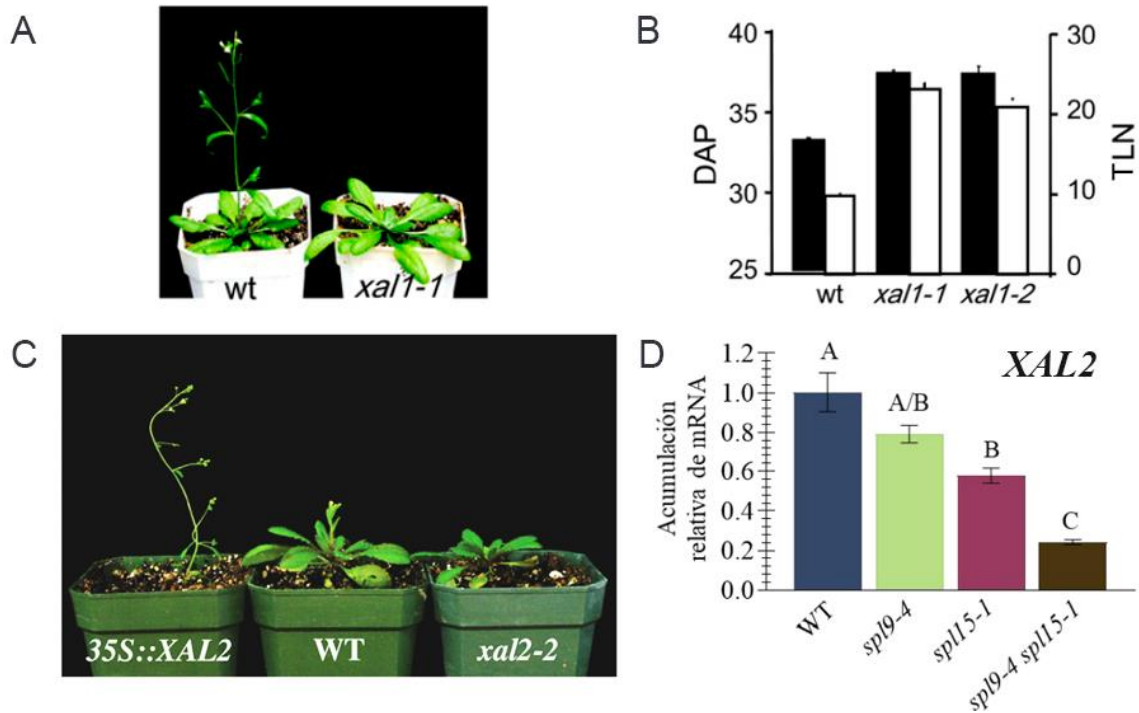


Figura 7. Participación de *XAL1* y *XAL2* como promotores de la transición a la floración. (A) Fenotipo de floración tardía en el mutante *xal1-1* comparado con el WT que ya se observa que presenta el escapo y flores en el ápice, ambas plantas de 32 días de edad crecidas en DL. (B) Dos alelos mutantes *xal1* florecen tardíamente en comparación con las plantas WT en DL. Las barras negras indican los días que tardaron en florecer a partir del día de siembra (*Days After Planting*, DAP) y las barras blancas indican el número de hojas de roseta cuando el tallo alcanza 1 cm (*Total Leaf Number*, TLN) (Tapia-López *et al.*, 2008). (C) La línea sobreexpresora *35S::XAL2* es de floración temprana y el mutante *xal2-2* es tardío con respecto a las plantas WT. Plantas de aproximadamente 29 días de edad crecidas en DL. (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015). (D) SPL9 y SPL15 regulan positivamente a *XAL2* en el ápice de plantas de 36 dps (días post-siembra) crecidas en DC (Quiroz, 2020).

con la edad de forma similar a lo que sucede con los *SPLs* (figura 6B; Schönrock *et al.*, 2006), por lo que es factible pensar que este MADS-box tiene un papel en las transiciones de fase del desarrollo o en otros procesos aún no descritos.

Otro MADS-box que participa en la transición a la floración es *XAL1* (*AGL12*). Líneas mutantes en este gen presentan un fenotipo de floración tardía sutil en DL respecto a las plantas silvestres, pero no en otras condiciones de crecimiento como en DC, en respuesta a GAs, o a la vernalización, por lo que parece ser que participa específicamente en la

respuesta al fotoperiodo de DL (figura 7A-B; Tapia-López *et al.*, 2008). El doble mutante *co xal1* florece más tardíamente que los mutantes sencillos. Este fenotipo aditivo sugiere que el mecanismo por el cual XAL1 estaría actuando, es independiente de la señalización de CO (Domínguez Román, 2012). Datos más recientes indican que el mRNA de *XAL1* se incrementa con la edad en el ápice de las plantas (García Ponce de León, comunicación personal).

XAL2 es otro MADS-box que también participa en la transición a la floración. El mutante *xal2-2* es de floración tardía en ambos fotoperiodos de crecimiento, particularmente en DC. Mientras que las líneas sobreexpresoras de este gen (*35S::XAL2*) florecen tempranamente respecto a las plantas silvestres, indicando que XAL2 es suficiente para acelerar la floración (figura 7C; Pérez-Ruiz *et al.*, 2015). Debido a que en DC la floración depende en buena medida de los factores SPLs, se analizó y demostró que SPL9 y SPL15 regulan positivamente a *XAL2* (Quiroz, 2020). Sin embargo, hasta ahora se desconocía si existía una regulación similar en condiciones de DL.

Este trabajo está enfocado en analizar la regulación cruzada entre *XAL1*, *XAL2* y *AGL19* y algunos *SPLs* como *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15*, para tener una aproximación en la regulación existente entre estas dos familias de factores transcripcionales cuando las plantas son crecidas en DL.

3. Hipótesis

Si algunos miembros de las familias de factores transcripcionales MADS-box y SPL participan en la transición a la floración, entonces, *AGL19*, *XAL1* y *XAL2* y *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* podrían regularse entre sí para promover este proceso en condiciones inductivas del desarrollo en *Arabidopsis thaliana*.

4. Objetivo general

Determinar la regulación entre los genes *AGL19*, *XAL1* y *XAL2* y *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* en hojas y ápices durante la transición a la floración de *Arabidopsis thaliana* en día largo.

4.1 Objetivos particulares

- Corroborar que las líneas *spl3-1*, *spl5-1*, *spl9-4*, *spl15-1* y el doble mutante *spl9-4 spl15-1* sean mutantes de expresión nula.
- Conocer el efecto que tienen *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* en la regulación de la expresión de *AGL19*, *XAL1* y *XAL2* durante la transición a la floración de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de día largo.
- Determinar la regulación de *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* por *XAL1* y *XAL2*, durante la transición a la floración de *Arabidopsis thaliana* en condiciones inductivas de crecimiento.

5. Materiales y Métodos

5.1 Líneas de plantas y condiciones de crecimiento

Las plantas silvestres (WT) y los mutantes utilizados *xal1-2* y *xal2-2*, así como *spl5-1* (SAIL_265_D02), *spl9-4* (SAIL_150_B05), *spl15-1* (SALK_074426) y el doble mutante *spl9-4 spl15-1* (N67865) se encuentran en el fondo Columbia-0 (Col-0). El mutante *spl3-1* (FLAG_173C12) fue aislado originalmente en el fondo Wassilewskija (Ws) y fue introgresado 6 veces en Col-0 (Xu *et al.*, 2016). La localización y orientación de cada mutación se encuentra representada en el anexo I.

Las semillas fueron estratificadas durante 3 días a una temperatura de 4°C y se sembraron en un sustrato compuesto por 75% de la Mezcla #3 Sunshine Fina Especial (Sungro), 15% agrolita y 10% vermiculita. Las plantas fueron crecidas en un cuarto controlado con una temperatura de 22°C y un fotoperiodo de DL (16 horas de luz y 8 de oscuridad) con una intensidad lumínica de 7500 luxes. El riego se llevó a cabo 2 veces a la semana, una vez con agua y otra con una solución de nutrientes de Flora Series como se especifica en la tabla II.

Tabla II. Cantidades utilizadas de cada componente de la solución concentrada de nutrientes de Flora Series utilizada para regar a las plantas en crecimiento.

Flora Series (General Hydroponics)	Plantas de 0 a 15 dps	Plantas de más de 15 dps
FloraGro	0.5 mL/L	1.5 mL/L
FloraMicro	0.5 mL/L	1 mL/L
FloraBloom	0.5 mL/L	0.5 mL/L

5.2 Colecta del material, extracción y cuantificación del RNA

Se sembraron 108 semillas de cada línea en 36 macetas con tres semillas cada una, se dejaron crecer hasta los 14 dps (días post-siembra) y se quitaron aquellas plantas cuyo crecimiento fuera diferente al promedio del tamaño, de forma que quedara una planta por maceta y así mantener una población homogénea en su desarrollo. Entre los 22 o 24 dps, que es cuando se observó la presencia del MI, se colectaron las muestras de tejido. Para determinar el sitio donde se expresan cada uno de los genes de interés y cómo es la regulación entre ellos, fueron utilizados 9 individuos por muestra, donde se colectaron por separado las hojas de roseta, así como los ápices enriquecidos con el meristemo apical aéreo.

El material colectado se congeló en nitrógeno líquido y se pulverizó en mortero estéril. Para la extracción del RNA total se añadió 1 mL del reactivo TRIzol (Invitrogen), se pasó a un microtubo, se homogeneizó en un agitador, se le añadió 0.2 mL de cloroformo, se agitó por inversión, se dejó incubar a temperatura ambiente por 3 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. a 4°C. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se realizó una segunda extracción con 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y otra con 1 volumen de cloroformo de igual forma que la primera extracción. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 1 volumen de isopropanol por 40 min. a -20°C y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. a 4°C. La pastilla obtenida fue lavada dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el RNA se resuspendió en agua grado molecular estéril libre de RNAsas, se cuantificó en un Nanodrop (Thermo Scientific), y, de acuerdo con las concentraciones obtenidas, los RNAs fueron diluidos a una concentración de 1µg/µL en todos los casos.

5.3 RT-PCR semicuantitativa

Se realizó la síntesis del DNA complementario (cDNA) de la forma siguiente: 2 μL del RNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL del oligonucleótido de dT (3'Ad primer; 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') 10 μM , 9 μL de agua grado molecular estéril libre de RNAsas y 1 μL de dNTPs 10 μM , se incubó a 65°C por 5 min y fue colocado inmediatamente en hielo (4 °C). Posteriormente se le añadió, a temperatura ambiente, 1 μL de la enzima reverso-transcriptasa SuperScript III (Invitrogen), 4 μL de amortiguador 5X y 2 μL de ditioneitol 0.1 M (DTT), para completar un volumen final de 20 μL , la síntesis de cDNA se llevó a cabo a 42 °C por 50 min. Finalmente, la reverso-transcriptasa fue inactivada a 70 °C por 15 min.

Los cDNAs se amplificaron por PCR de punto final. Cada reacción de 20 μL estuvo compuesta por 1 μL del cDNA de interés, 2 μL de amortiguador 10X sin Mg, 0.6 μL Mg 50 μM , 1.5 μL de dNTPs 10 μM , 1 μL de cada oligonucleótido (Forward y Reverse) 10 μM , 0.2 μL de la Taq DNA Polimerasa (Invitrogen) y 12.7 μL de agua grado molecular estéril libre de DNAsas. Las condiciones de amplificación y los oligonucleótidos utilizados se describen en la tabla III. Se utilizó como control constitutivo la acumulación del mensajero de *ACTINA2* (*ACT2*). Finalmente, las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1% y TBE 0.5x, al cual se le añadió EpiQuick como agente intercalante y fueron observados en un fotodocumentador BioRad.

Tabla III. Condiciones de amplificación utilizadas en las RT-PCR.

Gen (Fragmento esperado)	Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineamiento
<i>XAL1</i> (361 pb)	AGL12 RT-F AGL12 RT-R	TGGTCGTGGTTCTTCTTCTGCTAC TGTCTCCATGACTGCGAAGTTAGC	68°C
<i>XAL2</i> (458 pb)	AGL14 F-458 AGL14 R-458	GTAGAAAGATATCAAAAGCGAA GGAGGAAACTTTTTGAAGTGT	59°C
<i>XAL2</i> (379 pb)	AGL14Ex1(SQ)-F AGL14TR_R2	GGAAAGACAGAGATGAAGAGG GGTTCTCCAATTGTTGTAAGTC	60°C
<i>AGL19</i> (681 pb)	AGL19 F1 AGL19 R7	GTGAGGGGGCAAAACGGAGATG ATTCTTTTTGAAGAAGTTGTAAG	58°C
<i>AGL19</i> (550 pb)	AGL19 F1 AGL19 R6	GTGAGGGGGCAAAACGGAGATG ACGTTGATTGTGATGATGC	58°C
<i>SPL3</i> (308 pb)	SPL3_SQ_qF SPL3_ET_R	TCATGTTCCGATCTCTGGTC ACCATGTCGTAGGTTTAGCAG	62°C
<i>SPL5</i> (470 pb)	SPL5-F SPL5-R	CGATAGGTGCACTGTTAATTTGACT TCCGTGTAGGATTTAATACCATGACC	65°C
<i>SPL9</i> (404 pb)	SPL9_SQ_F2 SPL9_SQ_R	GATCTACTTCGAGGACGGTG CACCATTTTCGTAAAGCGAAG	60°C
<i>SPL15</i> (487 pb)	SPL15_SQ_F2 SPL15_SQ_R	TCTCTTTACGGAAACCCCAATG GGAAATCTGCTGGCTCCGAGA	64°C
<i>API</i> (527 pb)	API F (KIM) API R (KIM)	GCACCTGAGTCCGACGTC CATGCGGCGAAGCAGCCAAGG	60°C
<i>FT</i> (375 pb)	FT 5-3 FT 3-2	CCTGCTACAACCTGGAACAACCTTT GAACTACTATAGGCATCATCACCGTTTCG	66°C
<i>ACT2</i> (423 pb)	ACT2 F3 ACT2 R3	CCGATGGGCAAGTCATCACG TTAAGCCTTTGATCTTGAGAGC	62°C

Para todos los casos la temperatura de desnaturalización fue de 94°C por 30 s, y la de extensión de 72°C por 30 s. El número de ciclos se especifica en cada figura.

5.4 Densitometría

Para cuantificar de forma relativa las bandas obtenidas por RT-PCR se obtuvo la densidad relativa de cada banda de tamaño esperado en los mutantes, con respecto a la amplificación obtenida en la planta WT, a la que se le asignó el valor de 1, mediante el programa ImageJ. Esto se hizo tanto para el gen de interés como para *ACT2*, que se usó como control de carga, y posteriormente se dividió el valor sobre el de este último. Una vez que se obtuvieron los datos respectivos, se promedió solo cuando se tenía más de una réplica biológica y se calculó y graficó la desviación estándar. Para otros casos, la gráfica corresponde a lo de una sola muestra.

6. Resultados

6.1 Comprobación de la falta de acumulación de los transcritos *SPL* en sus respectivos mutantes

Para determinar si las líneas mutantes de los *SPLs* eran nulas se hicieron RT-PCR semicuantitativas tomando muestras de los ápices. No se observó la acumulación de los transcritos de los *SPLs* en *spl3-1*, *spl9-4* y *spl15-1*, de tal forma que estas líneas se pueden considerar como mutantes nulos. En *spl5-1* y el doble mutante *spl9-4 spl15-1* se observó una acumulación tenue de *SPL5* y *SPL15*, respectivamente. Sin embargo, en ambos mutantes hay reducción significativa en su acumulación con respecto a las plantas silvestres (figura 8), razón por la que pudieron utilizarse.

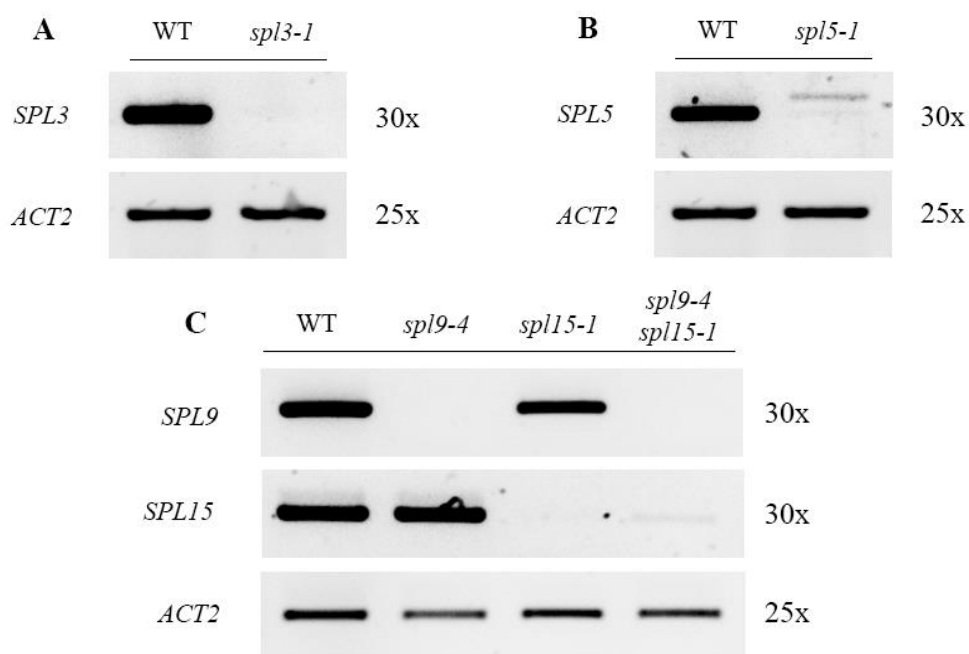


Figura 8. Acumulación del transcrito de cada uno de los *SPL* en las líneas mutantes utilizadas en este trabajo. Todos los mutantes se pueden considerar como de expresión nula o casi nula (A) *spl3-1*, (B) *spl5-1* y en (C) los mutantes sencillos *spl9-4* y *spl15-1*, así como su doble mutante. Cada uno de los mutantes no afecta la acumulación del otro gen. Se utilizó *ACT2* como control de carga. Las muestras utilizadas fueron ápices de plantas de 24 dps (A-B) y 22 dps (C) crecidas en DL. Del lado derecho se indica el número de ciclos utilizados en la PCR para cada gen.

6.2 Regulación de la expresión de *AGL19* por *SPL3*, *SPL9* y *SPL15*

Los factores SPLs pueden actuar tanto en las hojas como en el SAM (Fornara y Coupland, 2009; Xu *et al.*, 2016). Por lo que para conocer si *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* regulan a *AGL19*, *XAL1* y *XAL2*, se analizó la acumulación de estos MADS-box en ambos órganos.

Para el caso de *AGL19*, se observó disminución en su transcrito en las hojas del mutante *spl3-1* con respecto a las plantas silvestres en dos réplicas biológicas. Se muestra el resultado de uno de los geles (figura 9A) y la densitometría corresponde al promedio de ambos resultados (figura 9B). Esto muestra que *SPL3* actúa como un regulador positivo de *AGL19* en las hojas al momento de la transición a la floración cuando las plantas son crecidas en fotoperiodo de DL.

También se analizó la acumulación de este MADS-box en los mutantes sencillos y el doble mutante de *SPL9* y *SPL15*. En las hojas, *AGL19* tuvo una acumulación sutilmente menor en el mutante *spl9-4* y, por el contrario, aumentó considerablemente en el mutante *spl15-1* con respecto a las plantas silvestres (figura 9C-D). De manera interesante, la acumulación en el doble mutante de estos dos *SPLs* resultó con un nivel intermedio comparado con los mutantes sencillos (figura 9D), lo que sugiere que *SPL9* y *SPL15* regulan de forma antagónica a *AGL19* en las hojas.

En el ápice de *spl9-4*, *spl15-1* y *spl9-4 spl15-1* no se aprecian cambios en la acumulación de *AGL19*, hasta que se toma en cuenta que el control de carga *ACT2* se acumuló menos en los mutantes (figura 9E). Por lo tanto, al analizar la densidad relativa de las bandas de este MADS-box, resulta haber una mayor acumulación de *AGL19* en los mutantes sencillos, y aún más en el doble mutante (figura 9F). Esto sugiere que *SPL9* y *SPL15* regulan negativamente a *AGL19* en el ápice de las plantas en DL. En conjunto, los resultados aquí

mostrados sugieren que SPL3 y SPL9 actúan como reguladores positivos de *AGL19* en las hojas. Mientras que, en el ápice, SPL9 lo regula negativamente. Por su parte, SPL15 es un represor de *AGL19* en ambos tejidos. Por lo tanto, la regulación de estos SPLs sobre *AGL19* es tejido-dependiente.

Cabe mencionar que, comparativamente, se encontró mayor acumulación de *AGL19* en el ápice con respecto a las hojas en las plantas silvestres (figura 9C-F). Para corroborar que no hubiera contaminación entre los tejidos colectados, especialmente en los ápices, se utilizaron dos marcadores. El transcrito de *API* se acumula específicamente en el MF (Mandel *et al.*, 1992), mientras que *FT* se transcribe en las células acompañantes del floema de las hojas y peciolo (Takada y Goto, 2003; An *et al.*, 2004; Abe *et al.*, 2005). Aunque no se aprecia en el gel, la densitometría muestra que la acumulación de *API* aumenta en *spl9-4* y el doble mutante *spl9-4 spl15-1*, pero no así en *spl15-1* (figura 9F), sugiriendo que, contrario a lo que se esperaba, SPL9 regula negativamente a *API* en DL. Como se esperaba, *FT* no se acumula fuertemente en los ápices colectados, indicando que los RNAs obtenidos no contienen mucha contaminación de peciolo y hojas. Por su parte, se encontró que SPL9 y SPL15 regulan positivamente a *FT* en las hojas, de forma separada y conjunta, ya que en el doble mutante hubo una menor acumulación de este último (figura 9C). Este resultado concuerda con lo que se sabe para ambos SPLs, que regulan indirectamente a *FT* vía la activación de *miR172*, al menos en plantas crecidas en condición de DC de 10 horas de luz por 14 horas de obscuridad (Wu *et al.*, 2009).

Adicionalmente, en un experimento independiente se analizó la acumulación de *AGL19* en todos los mutantes sencillos *spls* en ambos tejidos. Sin embargo, estos resultados tienen que repetirse puesto que no se encontró acumulación de *AGL19* en el ápice de las plantas silvestres (anexo II). No obstante, los resultados sugieren que todos los SPL, con

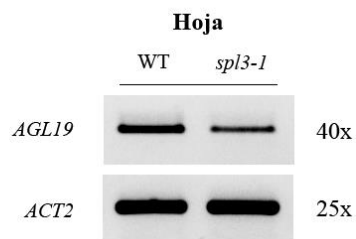
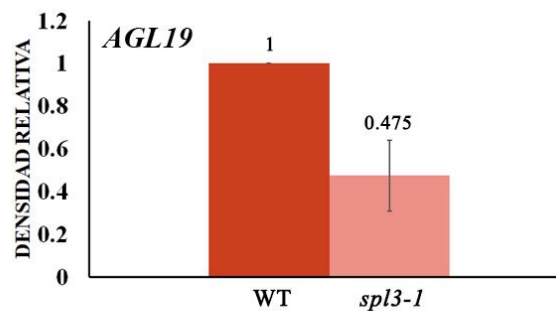
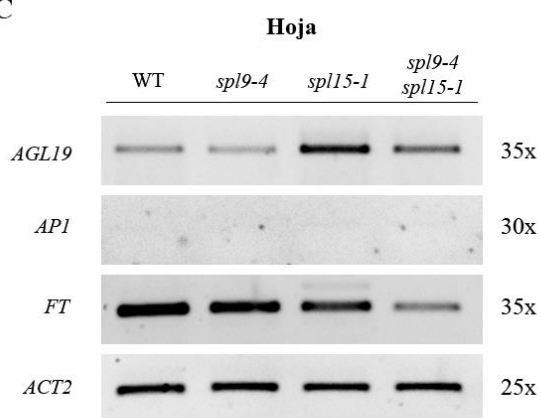
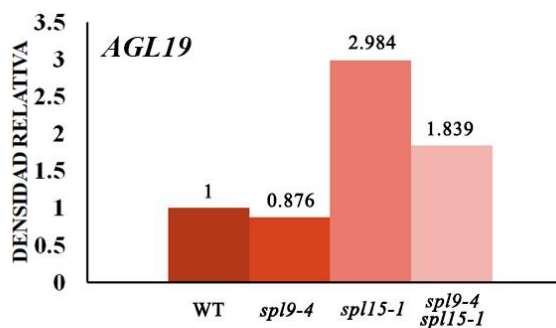
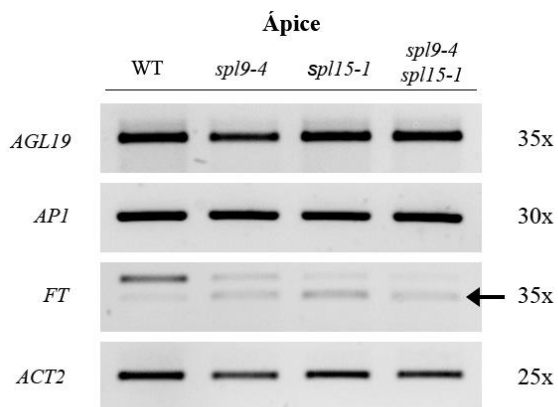
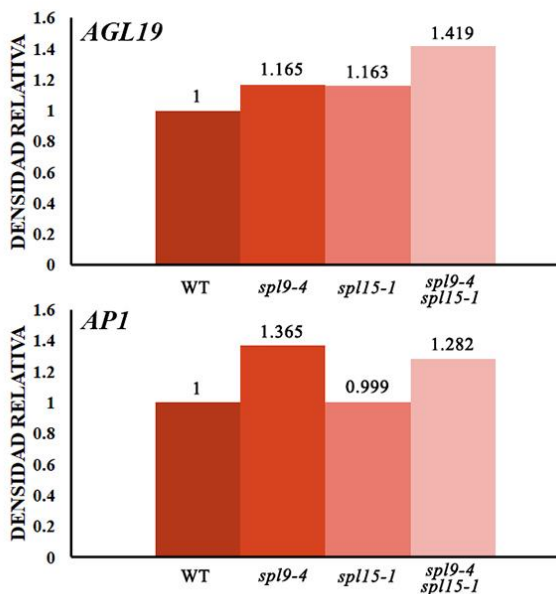
A**B****C****D****E****F**

Figura 9. Regulación de *AGL19* mediada por los SPLs durante la transición a la floración. (A) SPL3 regula positivamente al transcrito de *AGL19* en las hojas de plantas de 24 dps crecidas en DL. (B) Densidad relativa de las bandas de *AGL19* del panel A y otro no mostrado, correspondiente a una segunda réplica. (C) SPL9 regula positivamente y SPL15 negativamente al transcrito de *AGL19* en las hojas de plantas de 22 dps crecidas en DL. (D) Densidad relativa de las bandas de *AGL19* del panel C. (E-F) La regulación negativa de SPL9 y SPL15 sobre *AGL19* se aprecia en el ápice de plantas de 22 dps crecidas en DL cuando se normaliza con el control de carga *ACT2*. La flecha indica las bandas del tamaño esperado del transcrito de *FT*. La densidad relativa fue normalizada con los valores de *ACT2*. Datos correspondientes a una réplica biológica, excepto para el panel B, cuyos datos corresponden a la media de dos réplicas biológicas \pm la desviación estándar.

excepción de SPL3, tienden a regular negativamente a *AGL19* en ambos tejidos, ya que la acumulación de *AGL19* disminuye en *spl3-1* y, por el contrario, aumenta en *spl5-1*, *spl9-4* y *spl15-1* en las hojas, mientras que, en el ápice, parece que tiende a aumentar en todos los mutantes (anexo II).

6.3 SPL3, SPL5, SPL9 y SPL15 regulan a *XAL1* y *XAL2*

De forma parecida a lo que se observó con *AGL19*, los transcritos de *XAL1* y *XAL2* se acumulan más en el ápice que en las hojas, por ello en las hojas se requirió de una mayor cantidad de ciclos para apreciar mejor las diferencias en las amplificaciones (figura 10).

En las hojas, *XAL1* tuvo una acumulación sutilmente menor en *spl3-1*, no obstante, en *spl5-1*, *spl9-4* y *spl15-1* aumentó considerablemente comparado con las plantas silvestres (figura 10A-B). Por otra parte, *XAL2* disminuyó en *spl9-4* y *spl15-1* (figura 10A-B). Estos resultados sugieren que, en las hojas, SPL3 actúa como regulador positivo y SPL5, SPL9 y SPL15 como reguladores negativos de *XAL1*. Por el contrario, SPL9 y SPL15 regulan positivamente a *XAL2*.

En el ápice, la acumulación del transcrito de *XAL1* disminuyó en *spl3-1* (figura 10C-D). Sin embargo, al analizar la densidad relativa de las bandas de este MADS-box, fue evidente una disminución también en *spl15-1* (figura 10D). En cambio, *XAL2* disminuyó considerablemente en *spl9-4*, *spl15-1* y el doble mutante (figura 10E-F). Por lo tanto, en el ápice *SPL3* y *SPL5* actúan regulando positivamente a *XAL1*, y *SPL9* y *SPL15* inducen a *XAL2*, posiblemente de forma redundante.

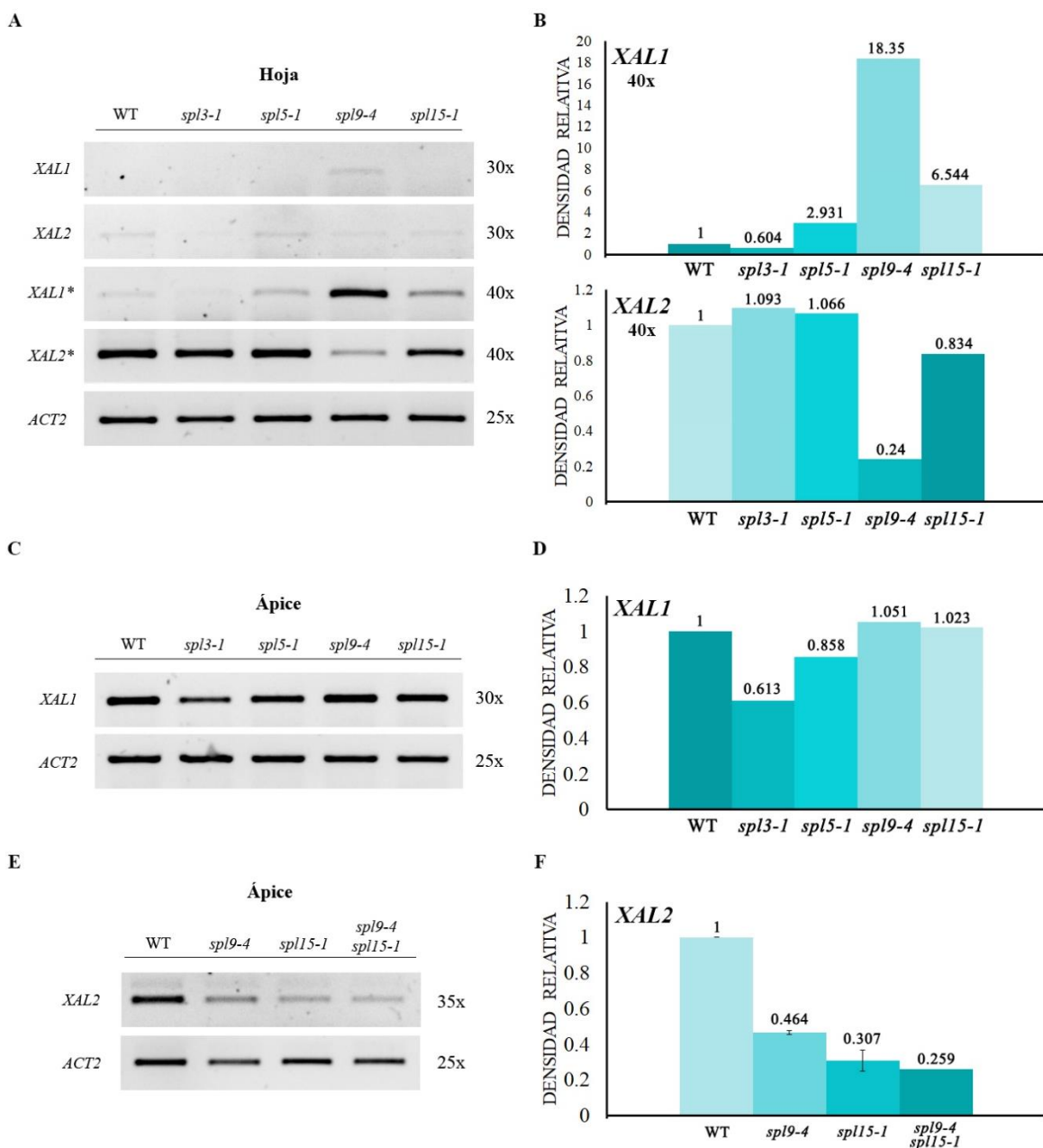


Figura 10. Regulación de *XAL1* y *XAL2* mediada por los SPL. (A) SPL5, SPL9 y SPL15 regulan negativamente al transcrito de *XAL1*, mientras que SPL9 y SPL15 regulan positivamente al transcrito de *XAL2* en las hojas de plantas de 24 dps crecidas en DL. (B) Densidad relativa de las bandas de 40x de *XAL1* (arriba) y *XAL2* (abajo) del panel A. (C) SPL3 y SPL15 regulan positivamente al transcrito de *XAL1* en el ápice de plantas de 24 dps crecidas en DL. (D) Densidad relativa de las bandas de *XAL1* del panel C. (E) SPL9 y SPL15 regulan positivamente a *XAL2* en el ápice de plantas de 22 dps crecidas en DL. (F) Densidad relativa de las bandas de *XAL2* del panel E. La densidad relativa fue normalizada con los valores de *ACT2* para todas las líneas utilizadas. Datos correspondientes a una réplica biológica, excepto para WT y los mutantes sencillos del panel F, cuyos datos corresponden a la media de dos réplicas biológicas \pm la desviación estándar.

En conjunto estos resultados sugieren que, en las hojas, donde estos MADS-box tienden a acumularse menos, SPL5, SPL9 y SPL15 participan como represores de *XAL1*. SPL3, por otra parte, regula positivamente a este MADS-box en ambos tejidos y parece que SPL15 lo regula positivamente solo en el ápice. Por otro lado, SPL9 y SPL15 regulan positivamente a *XAL2* tanto en las hojas como en el ápice.

6.4 *XAL1* y *XAL2* pueden regular a los SPLs

No se sabe mucho respecto a SPLs como blancos de factores MADS-box. Por lo que para identificar posibles SPLs blancos de *XAL1* y *XAL2*, se analizó la expresión de *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* en los mutantes *xal1-2* y *xal2-2*.

Los transcritos de *SPL3* y *SPL5* se acumulan de manera similar en las hojas y el ápice en plantas silvestres de *Arabidopsis* crecidas en DL (figura 11). Por otro lado, *SPL9* y *SPL15* se acumulan más en el ápice que en las hojas en las mismas condiciones (figura 11). En un principio las amplificaciones se hicieron a 30 ciclos, pero para apreciar mejor las posibles diferencias, se amplificó *SPL15* a una mayor cantidad de ciclos en las hojas (figura 11A), mientras que *SPL9* y *SPL15* se amplificaron con menos ciclos en el ápice (figura 11B).

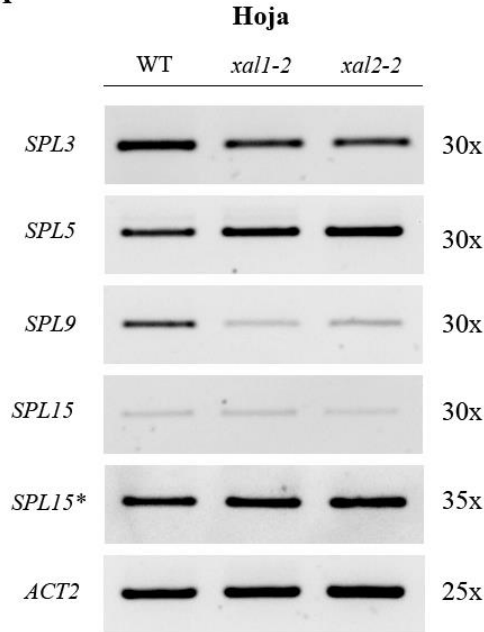
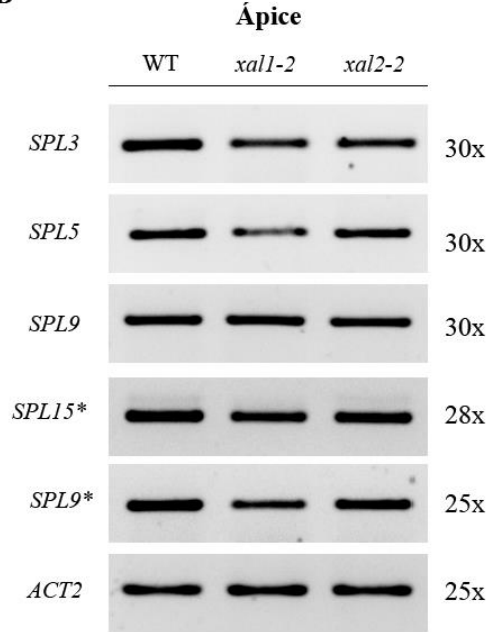
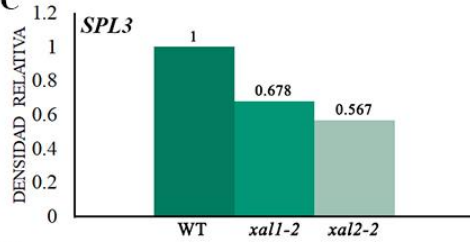
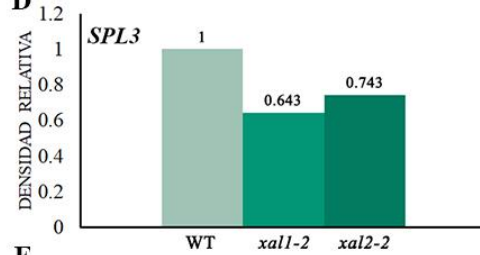
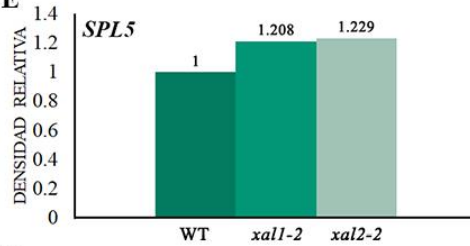
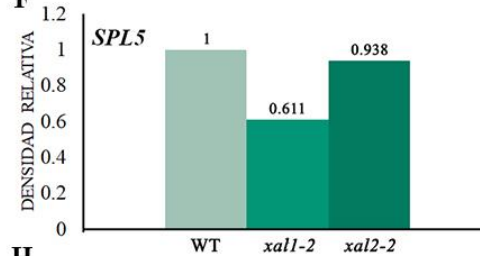
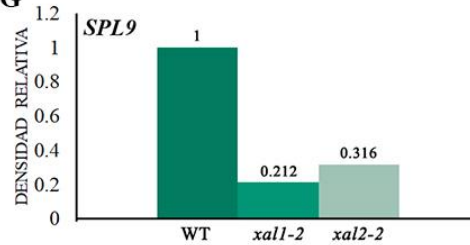
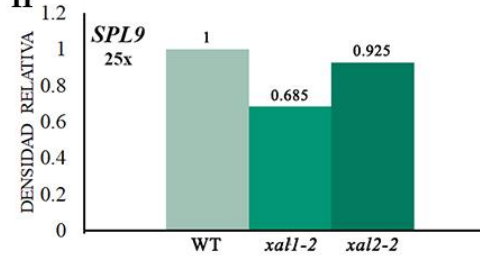
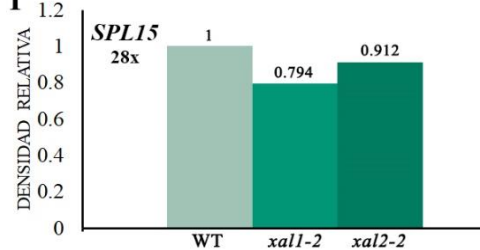
A**B****C****D****E****F****G****H****I**

Figura 11. Identificación de SPLs como blancos de los MADS-box XAL1 y XAL2.

(A) XAL1 y XAL2 regulan positivamente al transcrito de *SPL3* y *SPL9* y negativamente al transcrito de *SPL5* en las hojas. (B) XAL1 regula positivamente al transcrito de todos los *SPL* estudiados y XAL2 regula positivamente solo a *SPL3* en el ápice. (C, E y G) Densidad relativa de las bandas de *SPL3*, *SPL5* y *SPL9* en hoja (panel A). (D, F, H e I) Densidad relativa de las bandas de los *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* (25x) y *SPL15* (28x) de las reacciones en ápice (panel B). La densidad relativa fue normalizada con los valores de *ACT2*. Datos correspondientes a una réplica biológica. Se utilizaron plantas de 24 dps crecidas en DL.

Tanto en las hojas como en el ápice, se observó disminución del transcrito de *SPL3* en *xal1-2* y *xal2-2* (figura 11A-D), sugiriendo que XAL1 y XAL2 regulan positivamente a *SPL3* en ambos tejidos. Por otra parte, la acumulación de *SPL5* aumenta en las hojas en ambos mutantes y disminuye en *xal1-2* en el ápice (figura 11A-B y 11E-F), por lo que XAL1 y XAL2 actúan como reguladores negativos de *SPL5* en las hojas y, al contrario, XAL1 regula positivamente al mismo *SPL* en el ápice.

También se observó disminución del transcrito de *SPL9* tanto en *xal1-2* como en *xal2-2* en las hojas y en *xal1-2* en el ápice (figura 11A-B y 11G-H). Por lo tanto, XAL1 y XAL2 actúan como reguladores positivos de *SPL9* en las hojas y XAL1 actúa de la misma manera en el ápice. Finalmente, el transcrito de *SPL15* solamente disminuye en *xal1-2* en el ápice (figura 11B y 11I), sugiriendo que XAL1 actúa como regulador positivo de este *SPL15* en el ápice de las plantas.

El resumen de todas las interacciones se muestra más adelante en la figura 12.

7. Discusión

7.1 La regulación de *AGL19* por los factores de transcripción SPLs sugiere un papel de este MADS-box en el control de la transición a la floración en día largo

AGL19 promueve la transición a la floración cuando las plantas son vernalizadas y crecidas en DC (Schönrock *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconoce si tiene otras funciones. Se ha reportado que los niveles de su mensajero aumentan con la edad cuando las plantas son crecidas en DC, y que se acumula fuertemente en los ápices en esta misma condición (Schönrock *et al.*, 2006). En este trabajo detectamos, de forma similar, una baja acumulación de su transcrito en hojas y niveles mayores en el ápice de las plantas al momento de la transición a la floración cuando las plantas silvestres son crecidas en fotoperiodo DL. Por lo tanto, los resultados sugieren que el patrón de expresión de *AGL19* es independiente del fotoperiodo.

En las hojas, SPL3 y SPL9 regulan positivamente a *AGL19* (figura 12). Esto es interesante porque SPL3 y SPL9 regulan directa e indirectamente la expresión de *FT* (Wu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012). Así mismo, *AGL19* puede inducir a *FT* cuando las plantas son crecidas en DC, independientemente de FLC (Kang *et al.*, 2015). Sin embargo, aún no se ha demostrado que esto ocurra en DL, de ser así, una posibilidad es que la regulación de *AGL19* por SPL3 y SPL9 culmine en la inducción de *FT* por una vía independiente a CO. Lo cual sugeriría que la regulación sobre *FT* es controlada por diferentes mecanismos independientes del fotoperiodo. Otra posibilidad, es que *AGL19* participe en algún proceso del desarrollo de la hoja independientemente de la inducción de la floración.

AGL19 se induce con la edad, y regula negativamente a *SOC1* y positivamente a *FLC* y *XAL2* en DC (Yustis, 2021). Sin embargo, en DL se desconocen los blancos de este MADS-

box y, además, de forma interesante, aquí se encontró que en esta condición es reprimido por SPL9 y SPL15 (figura 9) y posiblemente también por SPL3 y SPL5 en el ápice (anexo II), sugiriendo que, en DL, AGL19 podría estar participando durante la transición a la floración por un mecanismo diferente al de DC.

Adicionalmente, sabemos que en DL *API* es inducido por SPL9 mediante su interacción con RGA (Yamaguchi *et al.*, 2014). Sin embargo, aquí se encontró que SPL9 regula negativamente a *API* (figura 9). Esto se puede explicar considerando que en el tiempo que se hizo la colecta, que es cuando se da la transición a la floración, existe una mayor concentración de GAs (Yamaguchi *et al.*, 2014); por lo tanto, las DELLAs como RGA se degradan por el proteosoma (Davière y Achard, 2013), SPL9 en ausencia de RGA parece reprimir a *API* (Yamaguchi *et al.*, 2014). De este modo, sería interesante estudiar el papel de *AGL19* en la integración de la señalización de las GAs con la dada por el desarrollo durante la transición a la floración en DL.

7.2 Regulación de la transición a la floración en respuesta a día largo mediada por XAL1 y los factores SPLs

Se ha intentado establecer el mecanismo por el cual XAL1 lleva a cabo su función como promotor de la floración en la condición inductiva de DL.

Sabemos que XAL1 actúa por una vía independiente de CO, ya que el doble mutante *co xal1* tiene un fenotipo de floración tardía sumatorio con respecto a los parentales (Domínguez Román, 2012). CO actúa a nivel de las hojas donde induce a *FT* (An *et al.*, 2004), mientras que *XAL1* se acumula principalmente en el ápice. Esto nos hace pensar una nueva hipótesis en la que XAL1 promueve la floración, al menos en parte, al regular

positivamente a *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* en el meristemo apical en fotoperiodo de DL (figura 12).

FT-FD induce la expresión de *SPL3/4/5* en respuesta al DL por una vía independiente de *miR156* en el meristemo apical (Jung *et al.*, 2012). Ahí promueven la activación de los genes de la identidad del MF, *LFY* y *API* junto con el módulo FT-FD (Jung *et al.*, 2016). Una posibilidad es que FT-FD active a *XAL1* y este a su vez regule a *SPL3/4/5* y a *SOC1*. A este respecto, resultados recientes en el laboratorio muestran que *FD* es epistático sobre de *XAL1*, lo que concuerda con esta hipótesis. Otro posible escenario es que *SPL3/4/5* sean activados por FT-FD y *XAL1* en conjunto. Por esta razón, sería interesante incluir a *SPL4* en futuros estudios. Finalmente, *SPL3/4/5* y *XAL1* se regulan mutuamente formando un asa de retroalimentación positiva en el ápice (figura 12), lo que contribuye con su participación en la inducción de la transición a la floración en DL.

Por otra parte, en las hojas *XAL1* es reprimido por *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* (figura 12), lo que apoya a que la participación de *XAL1* se lleva a cabo en el SAM. No obstante, este MADS-box puede regular positivamente a *SPL3* y *SPL9*, siendo consistente con la evidencia de que *XAL1* podría promover la expresión de *FT* (Tapia-López *et al.*, 2008). Se requiere de más investigación al respecto para poder saber si *XAL1* puede tener también un papel en las hojas.

7.3 XAL2 y los SPLs integran distintas señales que inducen la floración

xal2 tiene un fenotipo de floración tardía más fuerte cuando las plantas son crecidas en DC que en DL. Sin embargo, sabemos que, en DL CO regula positivamente a *XAL2* y a su vez este último regula positivamente a *SOC1* y *AGL24* (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015).

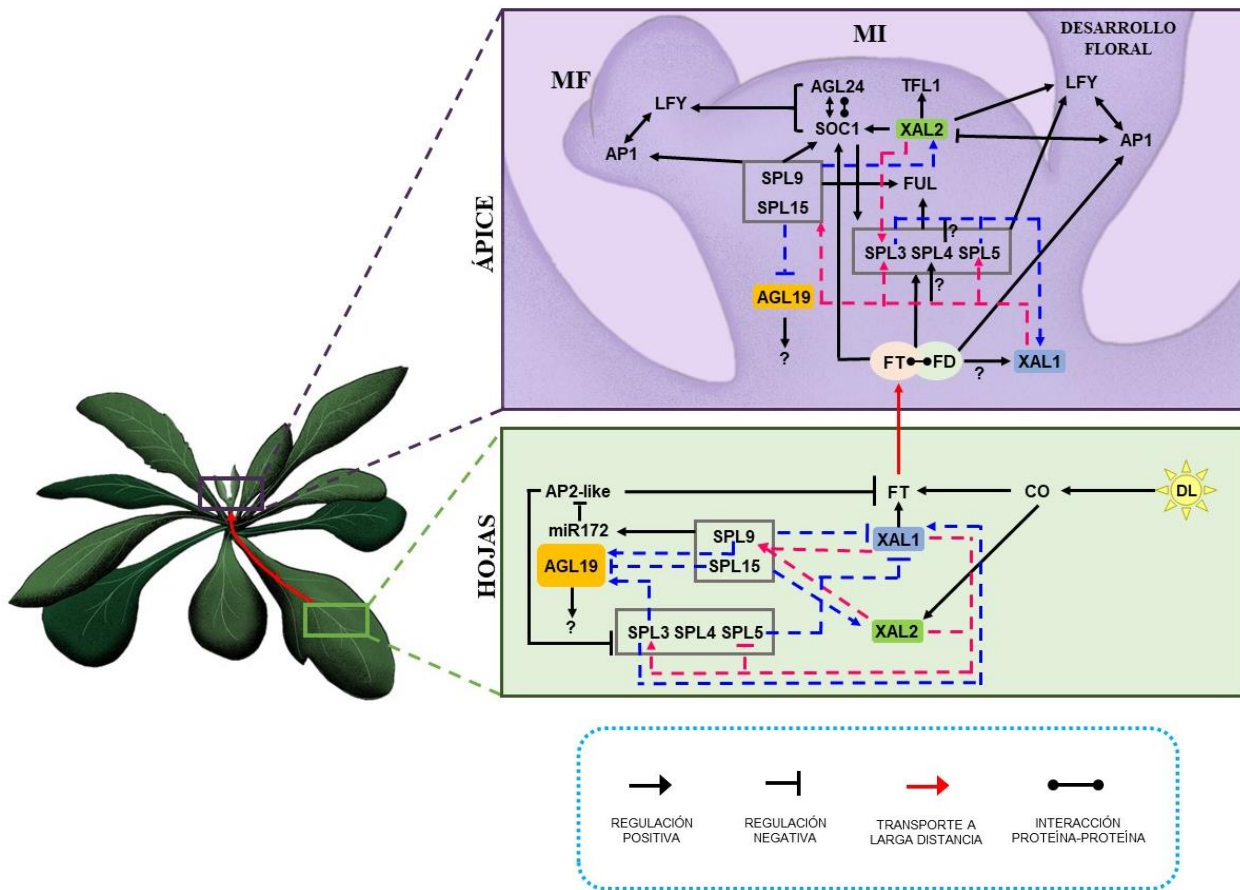


Figura 12. Representación esquemática de la red de regulación genética de la transición a la floración por fotoperiodo de DL en Arabidopsis. Las regulaciones ya publicadas están en negro, mientras que las que fueron encontradas en este trabajo se representan con líneas punteadas. Las regulaciones que van desde los MADS-box a los *SPLs* están anotadas en rosa, y en las que participan los *SPLs* sobre los MADS-box están anotadas en azul.

Aquí encontramos que *XAL2* es regulado positivamente por *SPL9* y *SPL15* tanto en las hojas como en el meristemo apical. Así mismo, *XAL2* induce a *SPL9* en las hojas, formando un asa de retroalimentación positiva entre ellos (figura 12). Este resultado apoya lo encontrado en día corto en el que *SPL9* y *SPL15* también regulan positivamente a *XAL2* (Quiroz, 2020), por lo que podemos decir que estos dos *SPLs* regulan positivamente a *XAL2* independientemente del fotoperiodo. Esto sugiere que *XAL2* es parte de la señalización por

el desarrollo, lo que explicaría porque el fenotipo del mutante es más notorio en ausencia de las señales inductivas de la floración.

Así mismo, se ha demostrado que *XAL2* es inducido por la adición de GAs exógenas para promover la floración (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015; Quiroz, 2020), y de manera interesante, *SPL9* y *SPL15* también participan en respuesta a esta fitohormona (Yamaguchi *et al.*, 2014; Hyun *et al.*, 2016).

Una vez que el SAM transita al estado reproductivo se transforma en un MI que dará origen a los MF. *SPL15* promueve principalmente la transición del SAM al MI y *SPL9* la transición del MI a los MF (Yamaguchi *et al.*, 2014; Hyun *et al.*, 2016). *XAL2*, por una parte, induce al gen que le da la identidad a la inflorescencia *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015) y, por otra parte, induce a *LFY* y *API* en los primeros estadios del desarrollo del MF (Pérez-Ruiz *et al.*, 2015). Se ha visto además que las GAs promueven la transición del SAM al MI, pero reprimen la formación de flores (Yamaguchi *et al.*, 2014). De esta forma, al aumentar las GAs, *SPL9* y *SPL15* podrían estar activando a *XAL2* y este a su vez a *TFL1* promoviendo así la formación del MI. Acto seguido *XAL2* junto con otros MADS-box como *SOC1*, *FUL* y/o *AGL24* podrían inducir la formación de los MF. En conjunto, los resultados aquí mostrados son consistentes con la participación descrita previamente de *XAL2* en la red genética de la transición a la floración.

7.4 La relación entre los MADS-box y los SPLs en la transición reproductiva podría estar conservada

XAL2 y *AGL19* se encuentran dentro del clado de *SOC1* (figura 13). Este clado, además de *SOC1*, incluye a *AGL42*, *AGL71* y *AGL72* (Martínez-Castilla y Alvarez-Buylla, 2003). Cabe destacar que todos los miembros del clado han sido identificados como promotores de la

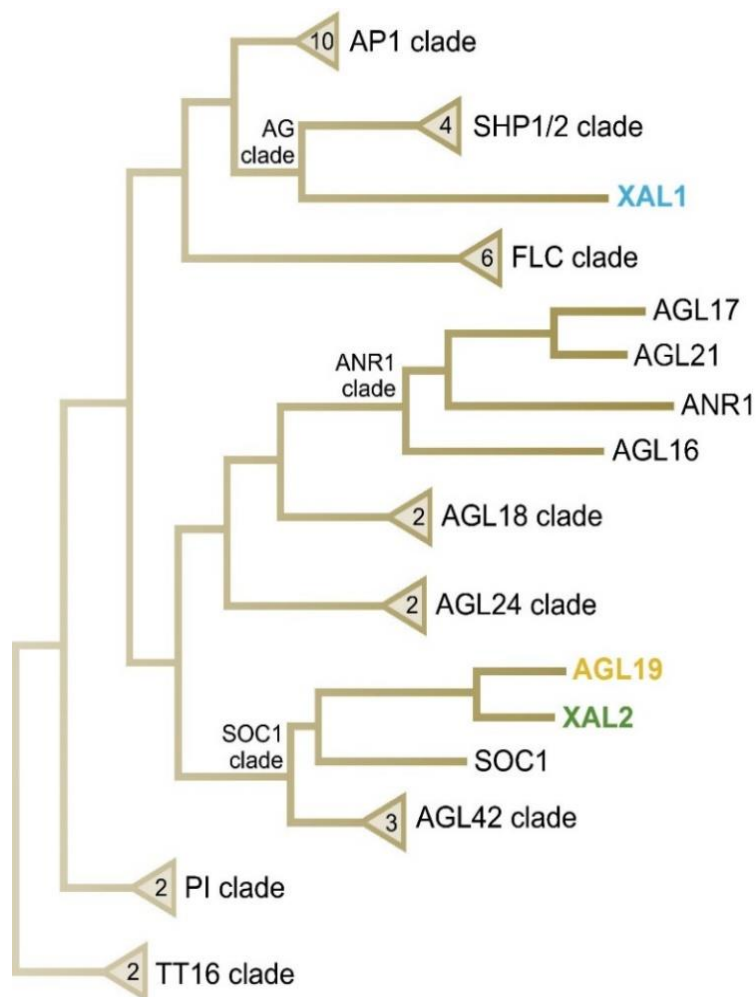


Figura 13. Árbol simplificado de las relaciones de parentesco entre los MADS-box de Tipo II de Arabidopsis. Se resaltan los MADS-box estudiados en este trabajo, *XAL1* (azul), *XAL2* (verde) y *AGL19* (amarillo). Los triángulos indican el número de genes que forman parte de cada clado. El clado de *AP1* incluye a *SEP1*, *SEP2*, *SEP3*, *SEP4*, *AGL13*, *AGL6*, *CAL*, *AP1**, *FUL** y *AGL79*. El clado de *AG* incluye a *SHP2*, *SHP1*, *AG*, *STK* y *XAL1**. El clado de *FLC* incluye a *MAF3*, *MAF2*, *MAF1*, *MAF5*, *FCL2* y *FLC*. El clado de *ANR1* incluye a *AGL17*, *AGL21*, *ANR1* y *AGL16*. El clado de *AGL18* incluye a *AGL15* y *AGL18*. El clado de *AGL24* incluye a *SVP* y *AGL24*. El clado de *SOC1* incluye a *AGL19**, *XAL2**, *SOC1** y al clado de *AGL42* que incluye a *AGL72*, *AGL71* y *AGL42**. El clado de *PI* incluye a *PI* y *AP3*. El clado de *TT16* incluye a *TT16* y *AGL63*. Los genes marcados con un asterisco (*) son regulados por los SPL (Modificado de Alvarez-Buylla *et al.*, 2019).

transición a la floración (Lee *et al.*, 2000; Schönrock *et al.*, 2006; Dorca-Fornell *et al.*, 2011; Pérez-Ruiz *et al.*, 2015). Como se mencionó anteriormente, se demostró que *SOC1* y *AGL42* son activados directamente por SPL9 (Wang *et al.*, 2009). Aquí observamos que SPL9 y SPL15 regulan positivamente a *XAL2*, mientras que a *AGL19* los mismos SPLs lo regulan negativamente en el ápice y de forma antagónica en las hojas, donde también es regulado positivamente por SPL3. Por lo que se puede especular que existe una estrecha relación al menos entre SPL9 y el clado de *SOC1*. Sin embargo, aún falta realizar un análisis más profundo para poder determinar si esta es una regulación directa.

Diversos estudios sugieren una posible conservación funcional de las proteínas con dominio SBP en el control de la transición a la floración vía la regulación de genes MADS-box a lo largo de la evolución de las angiospermas, ya que se ha visto que algunos SBP-box regulan a MADS-box ortólogos de otras angiospermas (Guo *et al.*, 2008; Preston y Hileman, 2010; Preston y Hileman, 2013). Así, SBP1 y SBP2 se unen y activan al ortólogo de *API*, *SQUA* en *Antirrhinum majus* (Plantaginaceae) (Klein *et al.*, 1996), o SPL1 se puede unir a las regiones reguladoras de *MADS5*, que es el ortólogo de *FUL* en *Betula pendula* (Betulaceae) (Lännenpää *et al.*, 2004).

La función, tanto de los factores con dominio MADS como de las proteínas con dominio SBP, en la transición a la fase reproductiva, también podría estar conservada en plantas sin flor (Dun *et al.*, 2019). MADS-box ortólogos, que especifican a los órganos florales en angiospermas, se encuentran acumulados en los estróbilos de distintas especies de gimnospermas (Theißen, 2001; Chanderbali *et al.*, 2010; Melzer *et al.*, 2010; Dun *et al.*, 2019). Sin embargo, estudiar el tiempo en que ocurre la transición reproductiva en gimnospermas es complicado. A pesar de ello, se ha comprobado que algunos MADS-box de gimnospermas pueden controlar el tiempo de floración en *Arabidopsis*, como es el caso

de *MADS9*, un MADS-box tipo MICK que se acumula en los estróbilos de *Ginkgo biloba*. Así mismo, cuando se sobreexpresa *MADS9* en *Arabidopsis* acelera la floración e induce a *FT*, *API*, *LFY* y *SOC1* y reprime a *SVP* y *AGL24* (Yang *et al.*, 2016).

Por otra parte, evidencia reciente sugiere que el módulo *miRNA-SPL* puede actuar como regulador de la diferenciación de estróbilos en la gimnosperma *Pinus massoniana* (Ye *et al.*, 2020). También participa en la inducción de la transición reproductiva y el desarrollo de los gametangióforos de la hepática talosa *Marchantia polymorpha* (Tsuzuki *et al.*, 2019). Por lo que no sería de extrañar que la relación entre estas familias de factores transcripcionales pueda estar conservada a lo largo de la evolución de las plantas.

8. Conclusiones

- Los mRNAs de los MADS-box *AGL19*, *XAL1* y *XAL2* tienden a acumularse más en el ápice que en las hojas de las plantas.
- En las hojas, *AGL19* es regulado positivamente por *SPL3* y *SPL9* y negativamente por *SPL15*. Mientras que, en el ápice, *SPL9* y *SPL15* lo regulan negativamente.
- *SPL3* induce y *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* reprimen la acumulación de *XAL1* en las hojas. En cambio, en el ápice *SPL3* y *SPL5* lo regulan positivamente.
- *SPL9* y *SPL15* regulan positivamente a *XAL2* tanto en hojas como en los ápices.
- *XAL1* regula positivamente a todos los *SPLs* estudiados en el ápice.
- *SPL3* es regulado positivamente por *XAL1* y *XAL2* en ambos tejidos.
- *XAL1* y *XAL2* regulan negativamente a *SPL5* y positivamente a *SPL9* en las hojas.

9. Perspectivas

En este trabajo se analizó la regulación genética en condiciones inductivas de DL durante la transición a la floración entre algunos miembros de dos familias de factores transcripcionales que tienen papeles vitales durante el desarrollo de las plantas, los MADS-box y los SPL. Sin embargo, este es un trabajo inicial del que se requiere de hacer más experimentos para corroborar los resultados obtenidos. Así, nos planteamos lo siguiente:

- Es importante que los cambios en los niveles de expresión encontrados en este trabajo sean corroborados con RTq-PCR con un mayor número de réplicas biológicas.
- También se propone generar dobles mutantes entre los MADS-box y los SPL que presentaron cambios en su expresión y analizar los fenotipos que estos pudieran generar en distintas condiciones de crecimiento, lo cual permitiría entender aún mejor la relación genética entre estos grupos de factores transcripcionales.
- Sería interesante analizar la regulación de *XAL1*, *XAL2* y *AGL19* y los *SPL* en DC, una condición no inductiva de la floración y en respuesta a las GAs, para poder comparar los cambios en su regulación en respuesta a señales endógenas del desarrollo y la inducción por el fotoperiodo de DL.

Referencias

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., y Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309(5737), 1052-1056.
- Adamczyk, B. J., y Fernandez, D. E. (2009). MIKC* MADS domain heterodimers are required for pollen maturation and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(4), 1713-1723.
- Adamczyk, B. J., Lehti-Shiu, M. D., y Fernandez, D. E. (2007). The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 50(6), 1007-1019.
- Alvarez-Buylla, E. R., Corvera-Poiré, A., Garay-Arroyo, A., García-Ponce, B., Jaimes-Miranda, F., y Pérez-Ruiz, R. V. (2011). 9. A MADS view of plant development and evolution. *Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis*, 181.
- Alvarez-Buylla, E. R., García-Ponce, B., Sánchez, M. D. L. P., Espinosa-Soto, C., García-Gómez, M. L., Piñeyro-Nelson, A., y Garay-Arroyo, A. (2019). MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms. *New Phytologist*, 223(3), 1143-1158.
- Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Vergara-Silva, F., y Yanofsky, M. F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal*, 24(4), 457-466.
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, 61(6), 1001-1013.
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., Hepworth, S., Mouradov, A., Justin, S., Turnbull, C., y Coupland, G. (2004). CONSTANS acts in the

- phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development*, 131(15), 3615-3626.
- Aukerman, M. J., y Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. *The Plant Cell*, 15(11), 2730-2741.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Birkenbihl, R. P., Jach, G., Saedler, H., y Huijser, P. (2005). Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *Journal of Molecular Biology*, 352(3), 585-596.
- Blázquez, M. A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M. R., y Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *The Plant Cell*, 10(5), 791-800.
- Blázquez, M. A., Ahn, J. H., y Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 33(2), 168.
- Bouché, F., Lobet, G., Tocquin, P., y Périlleux, C. (2016). FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1167-D1171.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R., y Coen, E. (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, 275(5296), 80-83.
- Cardon, G., Höhmann, S., Klein, J., Nettlesheim, K., Saedler, H., y Huijser, P. (1999). Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene*, 237(1), 91-104.
- Castelán-Muñoz, N., Herrera, J., Cajero-Sánchez, W., Arrizubieta, M., Trejo, C., Garcia-Ponce, B., Sánchez, M. D. L. P., Áñvarez-Buylla, E. R., y Garay-Arroyo, A. (2019). MADS-Box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 853.

- Chanderbali, A. S., Yoo, M. J., Zahn, L. M., Brockington, S. F., Wall, P. K., Gitzendanner, M. A., Albert, V. A., Leebens-Mack, J., Altman, N. S., Ma, H., dePamphilis, C. W., Soltis, D. E., y Soltis, P. S. (2010). Conservation and canalization of gene expression during angiosperm diversification accompany the origin and evolution of the flower. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52), 22570-22575.
- Cheng, J. Z., Zhou, Y. P., Lv, T. X., Xie, C. P., y Tian, C. E. (2017). Research progress on the autonomous flowering time pathway in *Arabidopsis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 477-485.
- Chiang, G. C., Barua, D., Kramer, E. M., Amasino, R. M., y Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, FLOWERING LOCUS C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11661-11666.
- Chien, J. C., y Sussex, I. M. (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology*, 111(4), 1321-1328.
- Cho, Y. H., Yoo, S. D., y Sheen, J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127(3), 579-589.
- Chouard, P. (1960). Vernalization and its relations to dormancy. *Annual Review of Plant Physiology*, 11(1), 191-238.
- Clark, S. E. (1996). The shoot meristem as a site of continuous organogenesis. *In Seminars in Cell & Developmental Biology*, 7(6), 873-880.
- Davière, J. M., y Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), 1147-1151.
- De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A. M., Greb, T., y Dean, C. (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), 16831-16836.

- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C. A., Taylor, J. M., Peacock, W. J., y Dennis, E. S. (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(16), 6680-6685.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., y Yanofsky, M. F. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*, 14(21), 1935-1940.
- Domínguez Román, A. L. (2012). Tesis de Licenciatura. Estudio de algunos genes MADS-box y sus interacciones genéticas en la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*.
- Dorca-Fornell, C., Gregis, V., Grandi, V., Coupland, G., Colombo, L., y Kater, M. M. (2011). The *Arabidopsis* SOC1-like genes AGL42, AGL71 and AGL72 promote flowering in the shoot apical and axillary meristems. *The Plant Journal*, 67(6), 1006-1017.
- Dun, M. A. O., Jiabao, Y. E., y Feng, X. U. (2019). Advances of the Flowering Genes of Gymnosperms. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 1-9.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R., y Yanofsky, M. F. (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development*, 127(4), 725-734.
- Fornara, F., y Coupland, G. (2009). Plant phase transitions make a SPLash. *Cell*, 138(4), 625-627.
- Fornara, F., de Montaigu, A., y Coupland, G. (2010). SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 141(3), 550-550.
- Fornara, F., Panigrahi, K. C., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J. A., y Coupland, G. (2009). *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Developmental Cell*, 17(1), 75-86.

- Gan, Y., Bernreiter, A., Filleur, S., Abram, B., y Forde, B. G. (2012). Overexpressing the ANR1 MADS-box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development. *Plant and Cell Physiology*, 53(6), 1003-1016.
- Gan, Y, Filleur, S, Rahman A, Gotensparre, S, y Forde, BG. (2005). Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222: 730–742.
- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., Corvera-Poiré, A., Jaimes-Miranda, F., Pacheco-Escobedo, M. A., Dubrovsky, J. G., Pelaz, S., y Álvarez-Buylla, E. R. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *The EMBO Journal*, 32(21), 2884-2895.
- García-Cruz, K. V., García-Ponce, B., Garay-Arroyo, A., Sanchez, M. D. L. P., Ugartechea-Chirino, Y., Desvoyes, B., Pacheco-Escobedo, M. A., Tapia-López, R., Ransom-Rodríguez, I., Gutierrez, C., y Alvarez-Buylla, E. R. (2016). The MADS-box XAANTAL1 increases proliferation at the Arabidopsis root stem-cell niche and participates in transition to differentiation by regulating cell-cycle components. *Annals of Botany*, 118(4), 787-796.
- García Ponce de León, B., Quiroz Pérez, S., Yustis Rubio, J. C., Martínez Hidalgo, T., Garay-Arroyo, A., Sánchez Jimenez, M. D. L. P., y Álvarez-Buylla, E. R. (2020). La regulación genética de la floración. *Mensaje Bioquímico*, 44, 20-30
- Goto, K., y Meyerowitz, E. M. (1994). Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes & Development*, 8(13), 1548-1560.
- Gou, J. Y., Felippes, F. F., Liu, C. J., Weigel, D., y Wang, J. W. (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis by a miR156-targeted SPL transcription factor. *The Plant Cell*, 23(4), 1512-1522.

- Guo, A. Y., Zhu, Q. H., Gu, X., Ge, S., Yang, J., y Luo, J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*, 418(1-2), 1-8.
- 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*, 55(2), 253-265.
- Harding, E. W., Tang, W., Nichols, K. W., Fernandez, D. E., y Perry, S. E. (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiology*, 133(2), 653-663.
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., y Huijser, P. (2000). Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 21(4), 351-360.
- He, J. (2017). Disertación Doctoral. Developmental Functions Of Mir156 And Mir157 In Arabidopsis.
- Heck, G. R., Perry, S. E., Nichols, K. W., y Fernandez, D. E. (1995). AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. *The Plant Cell*, 7(8), 1271-1282.
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., James Peacock, W., y Dennis, E. S. (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal*, 46(2), 183-192.
- Hisamatsu, T., y King, R. W. (2008). The nature of floral signals in Arabidopsis. II. Roles for *FLOWERING LOCUS T (FT)* and gibberellin. *Journal of Experimental Botany*, 59(14), 3821-3829.
- Hu, J. Y., Zhou, Y., He, F., Dong, X., Liu, L. Y., Coupland, G., Turck, F., y de Meaux, J. (2014). miR824-regulated AGAMOUS-LIKE16 contributes to flowering time repression in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(5), 2024-2037.

- Huijser, P., y Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138(19), 4117-4129.
- Hyun, Y., Richter, R., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Porri, A., y Coupland, G. (2016). Multi-layered regulation of *SPL15* and cooperation with *SOCI* integrate endogenous flowering pathways at the Arabidopsis shoot meristem. *Developmental Cell*, 37(3), 254-266.
- Imaizumi, T., y Kay, S. A. (2006). Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in Plant Science*, 11(11), 550-558.
- Irish, E. E., y Karlen, S. (1998). Restoration of juvenility in maize shoots by meristem culture. *International Journal of Plant Sciences*, 159(5), 695-701.
- Jack, T., Brockman, L. L., y Meyerowitz, E. M. (1992). The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, 68(4), 683-697.
- Jaeger, K. E., y Wigge, P. A. (2007). FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Current Biology*, 17(12), 1050-1054.
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K. C., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X. W., Valverde, F., y Coupland, G. (2008). Arabidopsis *COP1* shapes the temporal pattern of *CO* accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *The EMBO Journal*, 27(8), 1277-1288.
- Jung, J. H., Seo, Y. H., Seo, P. J., Reyes, J. L., Yun, J., Chua, N. H., y Park, C. M. (2007). The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(9), 2736-2748.
- Jung, J. H., Seo, P. J., Kang, S. K., y Park, C. M. (2011). miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in Arabidopsis developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, 76(1-2), 35-45.

- Jung, J. H., Ju, Y., Seo, P. J., Lee, J. H., y Park, C. M. (2012). The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 69(4), 577-588.
- Jung, J. H., Lee, H. J., Ryu, J. Y., y Park, C. M. (2016). SPL3/4/5 integrate developmental aging and photoperiodic signals into the FT-FD module in Arabidopsis flowering. *Molecular Plant*, 9(12), 1647-1659.
- Kang, M. J., Jin, H. S., Noh, Y. S., y Noh, B. (2015). Repression of flowering under a noninductive photoperiod by the *HDA9-AGL19-FT* module in Arabidopsis. *New Phytologist*, 206(1), 281-294.
- Kaufmann, K., Melzer, R., y Theißen, G. (2005). MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene*, 347(2), 183-198.
- Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P., y Ahn, J. H. (2012). The *microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3* module regulates ambient temperature-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 159(1), 461-478.
- Klein, J., Saedler, H., y Huijser, P. (1996). A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. *Molecular and General Genetics MGG*, 250(1), 7-16.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., y Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286(5446), 1960-1962.
- Koo, S. C., Bracko, O., Park, M. S., Schwab, R., Chun, H. J., Park, K. M., Seo, J. S., Grbic, V., Balasubramanian, S., Schmid, M., Godard, F., Yun, D. J., Lee, S. Y., Cho, M. J., Weigel, D., y Kim, M. C. (2010). Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS-box Gene AGAMOUS-LIKE6. *The Plant Journal*, 62(5), 807-816.

- Koornneef, M., Hanhart, C. J., y Van der Veen, J. H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG*, 229(1), 57-66.
- Lännenpää, M., Jänönen, I., Hölttä-Vuori, M., Gardemeister, M., Porali, I., y Sopanen, T. (2004). A new SBP-box gene BpSPL1 in silver birch (*Betula pendula*). *Physiologia Plantarum*, 120(3), 491-500.
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., Lee, J. S., Kwon, Y. M., y Lee, I. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes & Development*, 14(18), 2366-2376.
- Lee, J., Oh, M., Park, H., y Lee, I. (2008). *SOC1* translocated to the nucleus by interaction with *AGL24* directly regulates *LEAFY*. *The Plant Journal*, 55(5), 832-843.
- Lee, J. H., Yoo, S. J., Park, S. H., Hwang, I., Lee, J. S., y Ahn, J. H. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes & Development*, 21(4), 397-402.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Chris A. Helliwell C. A., Ito, t., Meyerowitz, E., y Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 15(1), 110-120.
- Liu, C., Thong, Z., y Yu, H. (2009). Coming into bloom: the specification of floral meristems. *Development*, 136(20), 3379-3391.
- Mandel, M. A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., y Yanofsky, M. F. (1992). Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature*, 360(6401), 273-277.
- Mandel, M. A., y Yanofsky, M. F. (1998). The Arabidopsis AGL9 MADS-box gene is expressed in young flower primordia. *Sexual Plant Reproduction*, 11(1), 22-28.
- Martin, R. C., Asahina, M., Liu, P. P., Kristof, J. R., Coppersmith, J. L., Pluskota, W. E., Bassel, G. W., Goloviznina, N. A., Nguyen, T. T., Martínez-Andújar, C., Kumar, M. B.

- A., Pupel, P., y Nonogaki, H. (2010). The regulation of post-germinative transition from the cotyledon-to vegetative-leaf stages by microRNA-targeted SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN LIKE13 in Arabidopsis. *Seed Science Research*, 20: 89–96.
- Martínez-Castilla, L. P., y Alvarez-Buylla, E. R. (2003). Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13407-13412.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., y Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the *miR172* target *SMZ*. *PLoS biology*, 7(7), e1000148.
- May, P., Liao, W., Wu, Y., Shuai, B., McCombie, W. R., Zhang, M. Q., y Liu, Q. A. (2013). The effects of carbon dioxide and temperature on microRNA expression in Arabidopsis development. *Nature Communications*, 4(1), 1-11.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., y Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
- Melzer, R., Wang, Y. Q., y Theißen, G. (2010). The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 21, No. 1, pp. 118-128). Academic Press.
- Meyerowitz, E. M. (2001). Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiology*, 125(1), 15-19.
- Michaels, S. D., y Amasino, R. M. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell*, 11(5), 949-956.
- Michaels, S. D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Pelaz, S., Yanofsky, M., y Amasino, R. M. (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *The Plant Journal*, 33(5), 867-874.

- Michaels, S. D., Himmelblau, E., Kim, S. Y., Schomburg, F. M., y Amasino, R. M. (2005). Integration of flowering signals in winter-annual Arabidopsis. *Plant Physiology*, 137(1), 149-156.
- Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, C. B., Paek, N. C., Kim, S. G., y Lee, I. (2003). The *SOCI* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 35(5), 613-623.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., Wang, H., Jones, T., y Sheen, J. (2003). Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300(5617), 332-336.
- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., y Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching. *Science*, 329(5997), 1306-1311.
- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., y Araki, T. (2008). Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant and Cell Physiology*, 49(11), 1645-1658.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., y Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200.
- Pérez-Ruiz, R. V., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., Ugartechea-Chirino, Y., Villajuana-Bonequi, M., de Folter, S., Azpeitia, E., Dávila-Velderrain, J., Cruz-Sánchez, D., Garay-Arroyo, A., de la Paz Sánchez, M., Estévez-Palmas, J. M., y Alvarez-Buylla, E. R. (2015). *XAANTAL2* (*AGL14*) is an important component of the complex gene regulatory network that underlies Arabidopsis shoot apical meristem transitions. *Molecular Plant*, 8(5), 796-813.

- Pinyopich, A., Ditta, G. S., Savidge, B., Liljegren, S. J., Baumann, E., Wisman, E., y Yanofsky, M. F. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature*, 424(6944), 85-88.
- Poethig, R. S. (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250(4983), 923-930.
- Poethig, R. S. (2003). Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science*, 301(5631), 334-336.
- Poethig, R. S. (2013). Vegetative phase change and shoot maturation in plants. *Current Topics in Developmental Biology*, 105,125-152.
- Ponnu, J., Schlereth, A., Zacharaki, V., Działo, M. A., Abel, C., Feil, R., Schmid, M., y Wahl, V. (2020). The trehalose 6-phosphate pathway impacts vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 104(3), 768-780.
- Preston, J. C., y Hileman, L. C. (2010). SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN 1 initiates flowering in *Antirrhinum majus* through the activation of meristem identity genes. *The Plant Journal*, 62(4), 704-712.
- Preston, J. C., y Hileman, L. C. (2013). Functional evolution in the plant *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* gene family. *Frontiers in Plant Science*, 4, 80.
- Quiroz, S. (2020). Tesis de Maestría. Integración de XAANTAL2 (XAL2) en la red de regulación genética que permite la floración de *Arabidopsis thaliana* en condiciones no inductivas de crecimiento.
- Rédei, G. P. (1962). Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, 47(4), 443.
- Ratcliffe, O. J., Nadzan, G. C., Reuber, T. L., y Riechmann, J. L. (2001). Regulation of Flowering in *Arabidopsis* by an FLCHomologue. *Plant Physiology*, 126(1), 122-132.

- Ratcliffe, O. J., Kumimoto, R. W., Wong, B. J., y Riechmann, J. L. (2003). Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. *The Plant Cell*, 15(5), 1159-1169.
- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C., y Conti, L. (2013). GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *Plant Physiology*, 162(3), 1706-1719.
- Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A., y Imaizumi, T. (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science*, 318(5848), 261-265.
- Schmid, M., Uhlenhaut, N. H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D., y Lohmann, J. U. (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development*, 130(24), 6001-6012.
- Schönrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Köhler, C., Gruissem, W., y Hennig, L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator *AGL19* in the *FLC*-independent vernalization pathway. *Genes & Development*, 20(12), 1667-1678.
- Schultz, E. A., y Haughn, G. W. (1993). Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in Arabidopsis. *Development*, 119(3), 745-765.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., y Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8(4), 517-527.
- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H., y Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 67(1-2), 183-195.
- Shikata, M., Koyama, T., Mitsuda, N., y Ohme-Takagi, M. (2009). Arabidopsis SBP-box genes *SPL10*, *SPL11* and *SPL2* control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. *Plant and Cell Physiology*, 50(12), 2133-2145.

- Shim, J. S., Kubota, A., y Imaizumi, T. (2017). Circadian clock and photoperiodic flowering in Arabidopsis: CONSTANS is a hub for signal integration. *Plant Physiology*, 173(1), 5-15.
- Seo, E., Lee, H., Jeon, J., Park, H., Kim, J., Noh, Y. S., y Lee, I. (2009). Crosstalk between cold response and flowering in Arabidopsis is mediated through the flowering-time gene SOC1 and its upstream negative regulator FLC. *The Plant Cell*, 21(10), 3185-3197.
- Simpson, G. G., y Dean, C. (2002). Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time?. *Science*, 296(5566), 285-289.
- Smaczniak, C., Immink, R. G., Angenent, G. C., y Kaufmann, K. (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development*, 139(17), 3081-3098.
- Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., Pant, B. D., Scheible, W. R., y Bäurle, I. (2014). Arabidopsis miR156 regulates tolerance to recurring environmental stress through SPL transcription factors. *The Plant Cell*, 26(4), 1792-1807.
- Srikanth, A., y Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2013-2037.
- Takada, S., y 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. *The Plant Cell*, 15(12), 2856-2865.
- Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V., Kim, S. H., Acevedo, F., Pelaz, S., y Alvarez-Buylla, E. R. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, *XAL1* (*AGL12*), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1182-1192.
- Telfer, A., Bollman, K. M., y Poethig, R. S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124(3), 645-654.

- Theißen, G. (2001). Development of floral organ identity: stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(1), 75-85.
- Torti, S., y Fornara, F. (2012). AGL24 acts in concert with SOC1 and FUL during Arabidopsis floral transition. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1251-1254.
- Tsukaya, H., Shoda, K., Kim, G. T., y Uchimiya, H. (2000). Heteroblasty in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 210(4), 536-542.
- Tsuzuki, M., Futagami, K., Shimamura, M., Inoue, C., Kunimoto, K., Oogami, T., Tomita, Y., Inoue, K., Kohchi, T., Yamaoka, S., Araki, T., Hamada, T., y Watanabe, Y. (2019). An early arising role of the microRNA156/529-SPL module in reproductive development revealed by the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Current Biology*, 29(19), 3307-3314.
- Usami, T., Horiguchi, G., Yano, S., y Tsukaya, H. (2009). The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development*, 136(6), 955-964.
- van Dijken, A. J., Schluepmann, H., y Smeekens, S. C. (2004). Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiology*, 135(2), 969-977.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn, J. E., Stitt, M., y Schmid, M. (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120), 704-707.
- Wang, J. W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E., y Weigel, D. (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 20(5), 1231-1243.
- Wang, J. W., Czech, B., y Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138(4), 738-749.

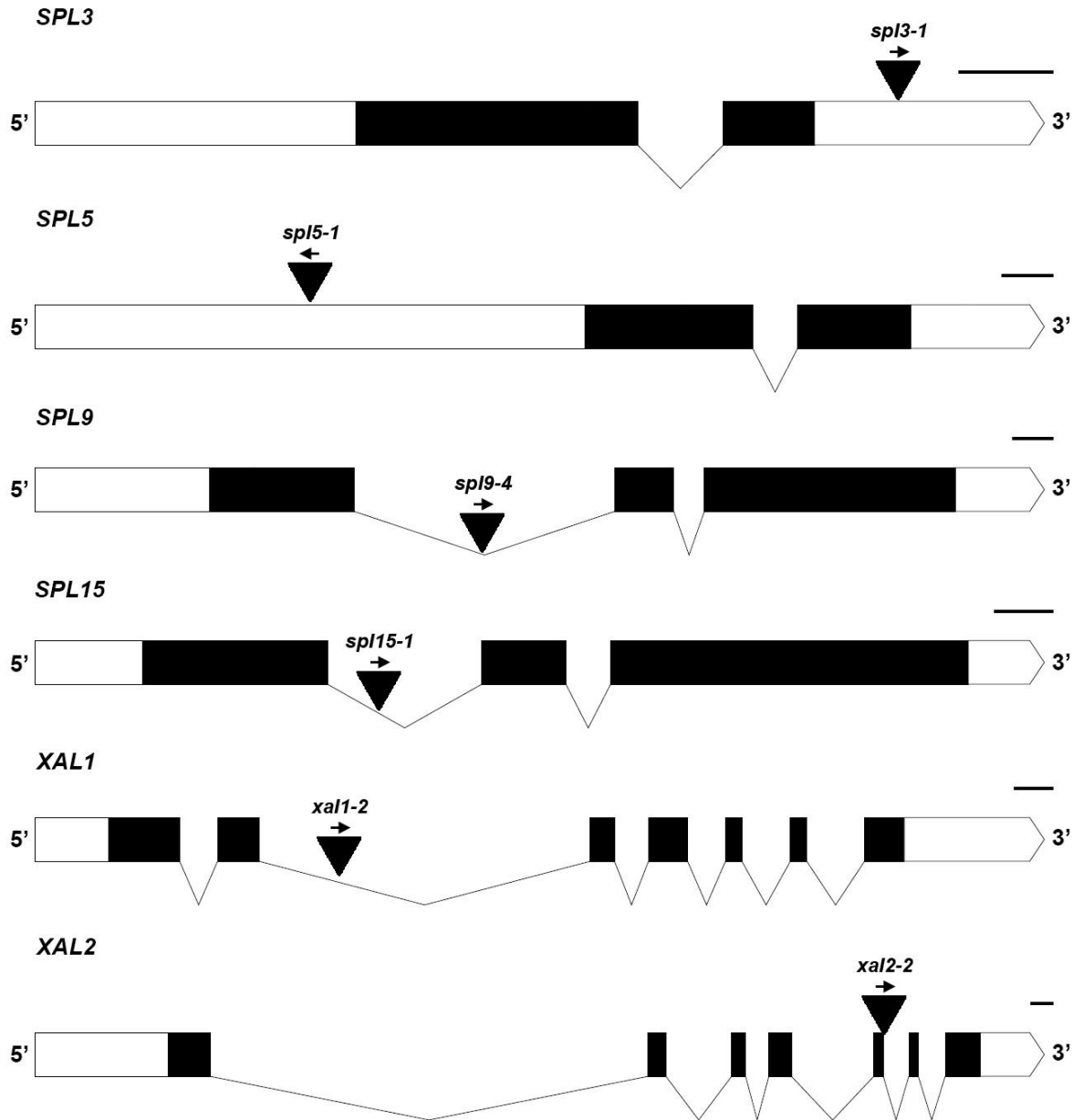
- Wang, Z., Wang, F., Hong, Y., Yao, J., Ren, Z., Shi, H., y Zhu, J. K. (2018). The flowering repressor SVP confers drought resistance in Arabidopsis by regulating abscisic acid catabolism. *Molecular Plant*, 11(9), 1184-1197.
- Wei, S., Gruber, M. Y., Yu, B., Gao, M. J., Khachatourians, G. G., Hegedus, D. D., Parkin, I. AP, y Hannoufa, A. (2012). Arabidopsis mutant sk156 reveals complex regulation of SPL15 in a miR156-controlled gene network. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1-17.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., y Meyerowitz, E. M. (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*, 69(5), 843-859.
- Wellmer, F. y Riechmann, J. L. (2010). Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends in Genetics*, 26(12), 519-527.
- Williams, L., y Fletcher, J. C. (2005). Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(6), 582-586.
- Willmann, M. R., y Poethig, R. S. (2011). The effect of the floral repressor FLC on the timing and progression of vegetative phase change in Arabidopsis. *Development*, 138(4), 677-685.
- Wilson, R. N., Heckman, J. W., y Somerville, C. R. (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology*, 100(1), 403-408.
- Wu, G., y Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development*, 133(18), 3539-3547.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., y Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell*, 138(4), 750-759.
- Xie, Y., Zhou, Q., Zhao, Y., Li, Q., Liu, Y., Ma, M., Wang, B., Shen, R., Zheng, Z., y Wang, H. (2020). FHY3 and FAR1 integrate light signals with the miR156-SPL module-mediated aging pathway to regulate Arabidopsis flowering. *Molecular Plant*, 13(3), 483-498.

- Xing, S., Salinas, M., Höhmann, S., Berndtgen, R., y Huijser, P. (2010). miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(12), 3935-3950.
- Xu, M., Hu, T., Zhao, J., Park, M. Y., Earley, K. W., Wu, G., Yang, L., y Poethig, R. S. (2016). Developmental functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 12(8).
- Yamaguchi, A., Wu, M. F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S., y Wagner, D. (2009). The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Developmental Cell*, 17(2), 268-278.
- Yamaguchi, N., Winter, C. M., Wu, M. F., Kanno, Y., Yamaguchi, A., Seo, M., y Wagner, D. (2014). Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in *Arabidopsis*. *Science*, 344(6184), 638-641.
- Yang, F., Xu, F., Wang, X., Liao, Y., Chen, Q., y Meng, X. (2016). Characterization and functional analysis of a MADS-box transcription factor gene (GbMADS9) from *Ginkgo biloba*. *Scientia Horticulturae*, 212, 104-114.
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., y Poethig, R. S. (2013). Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife*, 2, e00260.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., y Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 346(6279), 35.
- Yao, T., Park, B. S., Mao, H. Z., Seo, J. S., Ohama, N., Li, Y., Yu, N., Mustafa, N.F.B., Huang, C.-H., y Chua, N. H. (2019). Regulation of flowering time by SPL10/MED25 module in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 224(1), 493-504.
- Ye, Y., Wang, J., Ni, Z., Meng, X., Feng, Y., Yang, Z., y Xu, L. A. (2020). Small RNA and degradome sequencing reveal roles of miRNAs in strobilus development in masson pine (*Pinus massoniana*). *Industrial Crops and Products*, 154, 112724.

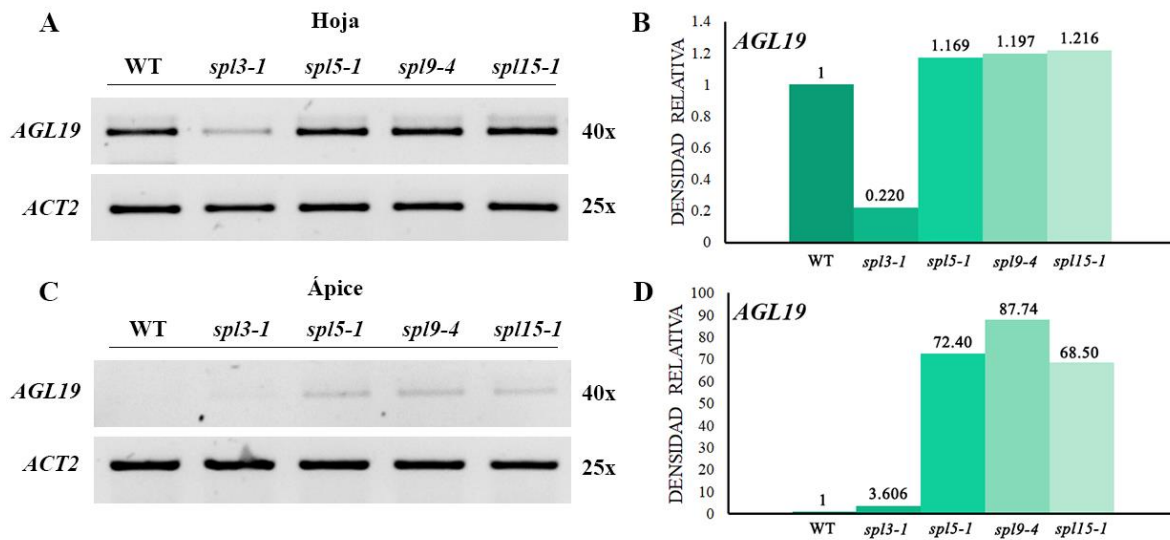
- Yoo, S. K., Chung, K. S., Kim, J., Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., Yoo, S. Y., Lee, J. S., y Ahn, J. H. (2005). Constans activates suppressor of overexpression of constans 1 through Flowering Locus T to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(2), 770-778.
- Yoo, S. K., Lee, J. S., y Ahn, J. H. (2006). Overexpression of AGAMOUS-LIKE 28 (AGL28) promotes flowering by upregulating expression of floral promoters within the autonomous pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(3), 929-936.
- Yoo, S. K., Wu, X., Lee, J. S., y Ahn, J. H. (2011). AGAMOUS-LIKE 6 is a floral promoter that negatively regulates the FLC/MAF clade genes and positively regulates FT in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 65(1), 62-76.
- Yu, L. H., Wu, J., Zhang, Z. S., Miao, Z. Q., Zhao, P. X., Wang, Z., y Xiang, C. B. (2017). Arabidopsis MADS-box transcription factor AGL21 acts as environmental surveillance of seed germination by regulating ABI5 expression. *Molecular Plant*, 10(6), 834-845.
- Yu, N., Cai, W. J., Wang, S., Shan, C. M., Wang, L. J., y Chen, X. Y. (2010). Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted SPL genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22(7), 2322-2335.
- Yu, N., Niu, Q. W., Ng, K. H., y Chua, N. H. (2015). The role of miR156/SPL s modules in Arabidopsis lateral root development. *The Plant Journal*, 83(4), 673-685.
- Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y. C., Horrer, D., Zhang, T. Q., Hao, Y. H., Feng, Y. Q., Wang, S., Schmid, M., y Wang, J. W. (2012). Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *The Plant Cell*, 24(8), 3320-3332.
- Yu, S., Cao, L., Zhou, C. M., Zhang, T. Q., Lian, H., Sun, Y., Wu, J., Huang, J., Wang, G., y Wang, J. W. (2013). Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *elife*, 2, e00269.

Yustis, J. C. J. (2021). Tesis de Maestría. Papel de AGL19 y acumulación de dos transcritos alternativos en la respuesta a la vernalización en *Arabidopsis thaliana*.

Anexos



Anexo I. Representación esquemática de las regiones genómicas y el sitio donde se encuentra la mutación de las líneas mutantes utilizadas. Localización y orientación de las mutaciones (triángulos) de cada línea mutante utilizada en este trabajo. Las líneas *spl3-1*, *spl5-1*, *spl9-4*, *spl15-1* y *xal1-1* presentan una inserción de T-DNA. Por otra parte, *xal2-2* presenta una inserción de transposón En-1. Con cajas negras están representados los exones, con cajas blancas las UTR y con líneas los intrones. En todos los casos la escala corresponde a 100 pb. Secuencias obtenidas del TAIR. Disponible en www.arabidopsis.org; Esquemas realizados en: Bhatla, Nikhil. 2012. Exon-Intron Graphic Maker. Disponible en <http://wormweb.org/exonintron>).



Anexo II. Regulación de *AGL19* mediada por *SPL3*, *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* durante la transición a la floración. (A) En las hojas, *SPL3* regula positivamente al transcrito de *AGL19*. Mientras que *SPL5*, *SPL9* y *SPL15* tienden a regularlo negativamente. (B) Densidad relativa de las bandas de *AGL19* del panel A. (C) *SPL5*, *SPL9*, y *SPL15* regulan negativamente al transcrito de *AGL19* en el ápice de las plantas. (D) Densidad relativa de las bandas de *AGL19* del panel C. Plantas de 24 dps crecidas en DL. La densidad relativa fue normalizada con los valores de *ACT2*. Datos correspondientes a una réplica biológica.