



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

**PARTICIPACIÓN DEL GEN *AGL19* EN EL
ESTABLECIMIENTO DEL MERISTEMO
FLORAL Y EL TIEMPO DE FLORACIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

David Cruz Sánchez

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Berenice García Ponce de León

**COMITÉ TUTOR: Dra. Ma. Elena Álvarez-Buylla Roces
Dra. Alejandra Covarrubias Robles**

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2010



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.

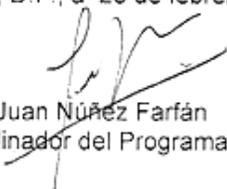
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **CRUZ SANCHEZ DAVID** con número de cuenta **98049325** con la tesis titulada "**PARTICIPACION DEL GEN AGL19 EN EL ESTABLECIMIENTO DEL MERISTEMO FLORAL Y EL TIEMPO DE FLORACION.**", realizada bajo la dirección de la **DRA. BERENICE GARCIA PONCE DE LEON:**

Presidente: DR. MIGUEL LARA FLORES
Vocal: DRA. MARIA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Secretario: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN
Suplente: DRA. MA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES
Suplente: DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de febrero de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Molecular, Evolución y Desarrollo de Plantas, Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología y fue parcialmente sustentado por los apoyos económicos PAPIIT IN210408; CONACyT 81433 y no. del proyecto de Elena (preguntar a Diana) además de mi beca de maestría otorgada por el CONACyT.

A la Dra. Berenice García Ponce de León por la buena dirección y asesoría durante el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del comité tutorar y a los sinodales por su asesoría y por sus valiosos comentarios:

Dra. Ma. Elena Álvarez-Buylla Roces

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Dr. Miguel Lara Flores

Dra. María del Rocío Cruz Ortega

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

A el M. en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz por el apoyo técnico en la realización de este trabajo.

Agradecimientos a título personal

A Karla Verónica por ayudarme a ser una mejor persona, animarme a hacer las cosas, porque compartimos nuestras vidas y experiencias y porque simplemente la quiero mucho.

Un especial agradecimiento a mis padres por su comprensión, apoyo (emocional y económico) que me han brindado durante toda mi vida.

A mis amigas (os) de la Fac.: Lintzy, Chela, María, Fernanda, Luis y Amaranta.

Gracias a mis compañeros del laboratorio de Genética Molecular, Evolución y Desarrollo de Plantas: don Rigo, Andrea, Fabiola, Aurora, Sinué, Karla Vero, Mario, Adriana Garay, Adriana Corvera, Berenice, Alma, Mariana, Oscar, Laura, Yara, Mari paz, Diana y Elena.

Contenido

Agradecimientos	III
Agradecimientos a título personal	IV
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. La biología del desarrollo en plantas	5
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> como sistema modelo	7
1.3. Desarrollo del meristemo apical aéreo	8
1.3.1. Origen y mantenimiento del SAM.....	10
1.4. Transición al estado reproductivo del SAM	13
1.4.1. La duración del día como regulador del tiempo de floración	15
1.4.2 Las giberelinas promueven la floración.....	16
1.4.3. La vernalización acelera el tiempo de floración.....	17
1.4.4. La vía autónoma regula la floración independientemente de señales externas.....	19
1.4.5. Integración de la transición a la floración	19
1.5. Interrelación entre los meristemos de inflorescencia y floral.....	21
1.5.1. Especificación de los órganos florales: El modelo ABC y la determinación del meristemo de flor	26
1.6. Familia de Genes MADS-box	28
2. Antecedentes	30
3. Hipótesis	33
4. Objetivos	33
4.1. General.....	33
4.1.1. Particulares	33
5. Materiales y Métodos	34
5.1 Plantas y condiciones de crecimiento.....	34
5.2. Análisis del tiempo de floración.....	35
5.3. Extracción de RNA	35
5.4. RT-PCR semicuantitativa	35

5.5. Northern blot.....	36
6. Resultados	37
6.1. El fenotipo causado por la sobreexpresión de <i>AGL19</i> es dosis dependiente.....	37
6.2. La sobreexpresión de <i>AP1</i> complementa parcialmente el fenotipo floral que causa la sobreexpresión de <i>AGL19</i>	40
6.3. <i>AGL19</i> y la regulación de la expresión de algunos genes que participan en el tiempo de floración e identidad del FM.....	42
6.4. <i>AGL19</i> promueve la floración al inducir prematuramente a <i>LFY</i> y <i>AP1</i>	43
6.5. Regulación de <i>AGL19</i> en relación con <i>AGL24</i> , <i>SOC1</i> y <i>AGL14</i>	44
6.6 La reversión causada por la sobreexpresión de <i>AGL19</i> probablemente es por la inducción de <i>TFL1</i>	46
7. Discusión.....	47
8. Conclusiones	52
9. Referencias.....	53
10. Abreviaturas.....	A

Resumen

Uno de los cambios más importantes en el ciclo de vida de las plantas es la transición del estado vegetativo al reproductivo. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se ha descrito que esta transición es controlada por diferentes vías de respuesta a condiciones ambientales y a señales endógenas que afectan el tiempo en que el meristemo vegetativo deja de producir hojas de roseta y cambia a un meristemo de inflorescencia (IM) que produce múltiples meristemas florales.

En la presente tesis analizamos el papel del gen *AGL19* que codifica para un factor de transcripción tipo MADS-box que participa en el establecimiento del meristemo de flor y el tiempo de floración en *Arabidopsis thaliana*. La sobreexpresión constitutiva de *AGL19* (35S::*AGL19*) induce la aceleración en el tiempo de floración y las flores se comportan parcialmente como inflorescencias. Sin embargo, la mutante *agl19-3* no presenta un fenotipo claro en el tiempo de floración ni en la morfología floral sugiriendo que hay otros genes redundantes funcionalmente a *AGL19*.

Nuestros resultados indican que la floración temprana y el fenotipo de reversión floral causado por la sobreexpresión de *AGL19* es dosis dependiente. Además, el análisis por medio de RT-PCR semicuantitativa muestra que la sobreexpresión de *AGL19* promueve la transcripción prematura de *LFY* y *AP1* pero no por la intermediación de otros genes del tiempo de floración, tales como *CO*, *FT*, *SOC1* ó *AGL24*. Además, la sobre-expresión de *AGL19* propicia la reversión del meristemo floral al promover la expresión de *TFL1* y cuando sobreexpresamos al mismo tiempo un represor natural de *TFL1*, como *AP1*, el fenotipo de reversión floral se complementa parcialmente. Nuestros datos sugieren que al sobreexpresar constitutivamente a *AGL19*, este puede realizar funciones redundantes con el gen homólogo *AGL14*.

Hibridaciones *in situ* preliminares muestran que *AGL19* se expresa principalmente en el meristemo de flor. Además, *AGL19* es regulado negativamente por *AGL14*, *AGL24* y *SOC1* los cuales se expresan en el meristemo de inflorescencia principalmente. En conclusión, proponemos que *AGL19* puede participar en el establecimiento y/o mantenimiento del meristemo de flor y podría estar involucrado en el mantenimiento de la expresión de *LFY* y/o *AP1*.

Abstract

One of the most important changes in the life cycle of plants is the transition from a vegetative to a reproductive state. This transition is controlled by different pathways that respond to endogenous signals and environmental conditions affecting the time when the vegetative meristem stops producing rosette leaves and changes in to an inflorescence meristem that produces multiple floral meristems. These three states of aerial meristems have distinct patterns of cell proliferation and differentiation during organogenesis.

In this thesis we analyze the role of *AGL19*, a MADS-box transcription factor in the establishment of floral meristems and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. Overexpression *AGL19* (*35S::AGL19*) lines are early flowering and have flowers that behave partially as inflorescences. However, the *agl19* mutant does not show any clear flowering time or floral morphology phenotype suggesting that there exist functional redundancy.

Our results indicate that the early flowering and floral reversion phenotype caused by overexpression of *AGL19* is dose dependent. Moreover, analysis by semiquantitative RT-PCR showed that overexpression of *AGL19* promotes premature transcription of *LFY* and *AP1*, but not some important flowering time regulators like *CO*, *FT*, *SOC1* and *AGL24* suggesting that this regulation might be direct. In addition, *AGL19* also promotes *TFL1* expression (an inflorescence meristem maintenance gene), which may explain the floral reversion phenotype. While *35S::AGL19* plants crossed to *35S::AP1* (a natural repressor of *TFL1*), the phenotype of floral reversion is partially complemented. Our data suggest that *TFL1* regulation by overexpression of *AGL19* is at least partially redundant with *AGL14* function.

In situ hybridization in tissue sections show that *AGL19* is highly expressed in the flower meristem, however, *AGL19* is negatively regulated by *AGL14*, *AGL24* and *SOC1*, which are excluded from this meristem at certain developmental stage. Therefore we propose that *AGL19* might play a role in the establishment and/or maintenance of floral meristem identity, and may be involved in direct induction of *LFY* and/or *AP1*.

1. Introducción

¿Cómo se forma a partir de una célula recién fertilizada un organismo pluricelular complejo? Esta es la pregunta general, que tratan de responder los estudiosos de la biología del desarrollo, durante mucho tiempo el desarrollo ha despertado el interés de muchos laboratorios en el mundo, por su complejidad como fenómeno biológico. Con la finalidad de acercarse a una respuesta comprensible, se estudian los mecanismos y procesos por los cuales las células, inicialmente indiferenciadas, logran coordinar programas específicos de crecimiento, división y diferenciación celular estableciendo así la disposición tridimensional y funcional de las diferentes estructuras anatómicas de organismos pluricelulares complejos. Por lo que el desarrollo es la denominación genérica que se aplica al conjunto de los procesos moleculares y celulares que permiten que el cigoto se desarrolle en un individuo adulto con la capacidad de contribuir a la perpetuación de su especie.

Uno de los mayores desafíos para los biólogos del desarrollo contemporáneos es establecer los mecanismos por los cuales las células generan, perciben e interpretan los determinantes fundamentales de los programas de desarrollo: el linaje, la información posicional y la ambiental. Por lo tanto, uno de los aspectos más importantes del desarrollo es la morfogénesis, la cual se define como la generación de la estructura corporal de un ser vivo y el de cada uno de sus órganos (Wolpert *et al.* 2002; Gilbert 2003).

Una herramienta de gran valor para la identificación de los agentes causales de la morfogénesis la constituyen los mutantes morfológicos, individuos portadores de un defecto genético que causa una morfología aberrante con respecto al tipo más abundante en la población o silvestre. El estudio de estos mutantes ha permitido la identificación de numerosos genes que juegan papeles cruciales en determinados programas de desarrollo.

El fenotipo de tales mutantes nos provee, en la mayoría de los casos, de información sobre el papel de genes concretos. Por otra parte, la sobre expresión constitutiva y/o ectópica de estos genes nos permite identificar su suficiencia en algún proceso (Wolpert *et al.* 2002; Gilbert 2003).

A lo largo de la historia, la mayoría de los estudios sobre procesos de desarrollo se han realizado en animales. De ahí se originan conceptos actualmente en uso tanto por los biólogos del desarrollo animal y vegetal, tales como los de determinación, diferenciación, totipotencial celular, formación de patrones, etc. (Wolpert *et al.* 2002; Gilbert 2003). Sin embargo, no puede ignorarse que algunos de los fundamentos de la biología del desarrollo moderna tienen su origen en estudios realizados en especies vegetales. Son ejemplos de ello la noción de homología (que propuso Goethe en 1790), la teoría celular, la identificación del núcleo y el protoplasma, el reconocimiento de la alternancia de generaciones y la denominación de las etapas de la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase). Todos estos conceptos nacen de aproximaciones descriptivas o experimentales en estudios de plantas (Meyerowitz 1994a, 2002). Paradójicamente, las plantas han recibido menos atención que los animales en lo relativo al análisis causal de su desarrollo. La supremacía del análisis causal sobre el meramente descriptivo se ha alcanzado en la biología del desarrollo vegetal con más de una década de retraso con respecto a lo sucedido entre los biólogos del desarrollo animal, en este sentido radica la importancia de estudiar el desarrollo vegetal, el cual puede seguir contribuyendo al avance de la ciencia (Meyerowitz 1994a, 2001).

1.1. La biología del desarrollo en plantas

Los mecanismos que controlan la organogénesis y la formación de patrones, permanecen aún por esclarecerse en muchos organismos, entre ellos las plantas. En las plantas la organogénesis se lleva a cabo durante todo su ciclo de vida. En la actualidad se han descrito algunos mecanismos por los que las células meristemáticas de un primordio perciben e interpretan su posición con respecto a otras células, para diferenciarse en órganos más complejos, por ejemplo, la disposición de las hojas en el tallo o filotaxia, está determinada por la distribución de las auxinas (una fitohormona) en el meristemo apical aéreo (Reinhardt *et al.* 2000).

El desarrollo vegetal presenta características propias que lo distinguen del animal, como la inexistencia de la migración celular provocada por la presencia de una pared celular rígida, lo que hace que las células hijas permanezcan junto a sus progenitoras. Este fenómeno ha facilitado el seguimiento de los linajes celulares y la comprobación de la existencia de estrictos controles que operan sobre el número y el plano de las divisiones celulares, ya que la posición de una célula viene determinada por la orientación de la división que la ha generado. Otra consecuencia de la inmovilidad de las células vegetales, es que su diferenciación tiene lugar en un contexto de células vecinas con un linaje común (Poethig 1987).

Otra de las características que singularizan el desarrollo vegetal es la totipotencialidad y la capacidad de desdiferenciación de la mayoría de las células de una planta, que permite la obtención de un organismo completo a partir de cualquiera de las partes (Hall 2000). La totipotencialidad es la manifestación más extrema de la plasticidad inherente del desarrollo vegetal y una prueba de que la identidad celular una vez establecida, debe ser mantenida activamente para evitar el retorno al estado indiferenciado de los meristemos (Taylor

1997). Para este mantenimiento de la identidad celular se han propuesto diversos mecanismos, entre ellos la existencia de receptores específicos y su interacción con sus ligandos situados en la pared de celular (Clark *et al.* 1997), o la transmisión simplástica de estos determinantes a través de los plasmodesmos que unen células vecinas (Schiefelbein *et al.* 1997; Taylor 1997).

Cabe añadir a las características hasta aquí mencionadas la sencillez de la morfología de las plantas, que están constituidas por tan sólo tres tipos de órganos vegetativos (la raíz, el tallo y las hojas), cuatro órganos que constituyen la flor (los sépalos, los pétalos, los estambres y el carpelo) y dos de reserva y protección (el fruto y los cotiledones). Estas estructuras están compuestas por únicamente diez tipos básicos de tejidos, que no integran más que quince tipos de células (Meyerowitz 1994a).

El desarrollo vegetal es fundamentalmente postembrionario, ya que durante la embriogénesis se conforma únicamente el plan básico del organismo y se definen el meristemo apical y el radicular. El embrión se organiza en un rudimento de lo que será el individuo adulto, que a su vez no se estructura de forma definida hasta después de la germinación (Barton y Poethig 1993; Long y Barton 1998). El crecimiento meristemático de las plantas es continuo y puede mantenerse, en el caso de las especies perennes, durante toda su vida. Esta indeterminación de su desarrollo dota a las plantas de una mayor flexibilidad para integrar las decisiones sobre diferenciación y morfogénesis en respuesta a los cambios ambientales. La plasticidad de su desarrollo representa una adaptación de las plantas a su vida autotrófica y sedentaria, ya que deben crecer continuamente para asegurarse un acceso permanente a los nutrientes o a la luz de su entorno, expandiendo o modificando las superficies corporales a través de las cuales tiene lugar su incorporación o percepción, respectivamente (Meyerowitz 1994b, a, 1999).

1.2. *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

A. thaliana fue propuesto convincentemente como sistema modelo por Rédei en 1975, sin embargo, fue hasta finales de la década de los ochenta cuando esta planta se convirtió en uno de los organismos experimentales más importantes en biología vegetal (Redei 1975; Bowman 1994; Meyerowitz 1994a, 2001). Dado que, *A. thaliana* reúne una serie de características que la han convertido en el objeto de estudio por excelencia de la mayoría de los laboratorios dedicados a la biología experimental de las plantas. Una de ellas es su tamaño pequeño (30 cm de altura) lo que permite siembras de hasta 10.000 plantas/m². Su ciclo de vida relativamente corto, de entre 4-8 semanas cuando es cultivada a ~22°C. Es una especie muy prolífica, capaz de producir hasta 10,000 semillas por planta, la realización de cruza es relativamente sencilla. El mantenimiento de líneas puras no presenta dificultad alguna, ya que la planta normalmente se autofecunda y sus semillas pueden permanecer viables durante varios años a temperatura ambiente y con baja humedad relativa (Meyerowitz y Chang 1988; Bowman 1994).

Además, existen varios procedimientos de transformación estable por infección con *Agrobacterium tumefaciens*, que han posibilitado la obtención de una amplia colección de mutantes por inserción de T-DNA, así como plantas que sobreexpresen algún gen en particular. Se han creado tres centros de conservación y distribución de estirpes, uno en Europa (NASC; Nottingham *Arabidopsis* Stock Center), otro en Estados Unidos (ABRC; *Arabidopsis* Biological Resource Center) y el tercero en Japón (SENDAI *Arabidopsis* Seed Stock Center). En la actualidad se tiene secuenciado el genoma completo de esta especie. Cabe destacar, por último, que existe un vasto repertorio de recursos informáticos disponibles libremente en Internet para todo aquel que quiera investigar diversos aspectos de *A. thaliana*.

Así mismo esta planta presenta muchas de las características típicas de otras angiospermas en lo referente a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuesta al ambiente. En consecuencia, los resultados de la investigación en *A. thaliana* son potencialmente aplicables a otras planta con flores (Meyerowitz 1994b).

A. thaliana se ha convertido en una de las pocas especies vegetales en las que pueden conjugarse las técnicas clásicas de análisis genético con las de la ingeniería genética, a un nivel alcanzado hasta ahora únicamente en animales como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Meyerowitz 1999, 2002). Por lo que, la utilización de este sistema modelo conlleva una gran importancia en la disección genética y molecular de varios aspectos del desarrollo de las plantas. Entre ellos, ha permitido el avance del conocimiento del desarrollo de los meristemas vegetales.

1.3. Desarrollo del meristemo apical aéreo

El estudio de los meristemas es de gran importancia para la biología del desarrollo vegetal, dado que a partir de ellos se originan los órganos postembrionarios (raíces, hojas, tallos, flores y meristemas axilares). Además, los meristemas apicales tanto el de raíz como el aéreo, son estructuras capaces de perpetuarse ya que además de producir órganos se regeneran a sí mismos continuamente. Esto es así ya que las células meristemáticas conocidas como células iniciales apicales conservan la capacidad de dividirse a lo largo de todo el ciclo de vida de la planta. Cuando una de las células iniciales se divide, una de sus hijas hereda la característica de mantenerse indiferenciada y la otra entra en un proceso de diferenciación (Taylor 1997; Long y Barton 1998).

El meristemo permite la formación de diversos órganos, como resultado del control del balance entre los principales procesos celulares como la quiescencia, proliferación y la

diferenciación. Justamente dependiendo de este balance, los meristemos se han clasificado en dos tipos principales: indeterminado y determinado. El primero mantiene su capacidad regenerativa y una tasa de proliferación constante, ejemplos de este tipo de meristemo son el de raíz (RAM, del inglés root apical meristem), el meristemo apical aéreo o del tallo (SAM, del inglés Shoot Apical Meristem). Por el contrario, en meristemo determinado la tasa de diferenciación celular es mayor que la tasa de proliferación y se consume en la formación de órganos, por ejemplo: el Meristemo de flor (FM) (Mandel y Yanofsky 1995a; Running *et al.* 1995; Liljegren y Yanofsky 1996; Bowman y Eshed 2000; Sharma y Fletcher 2002).

En este trabajo me enfocaré en el desarrollo del SAM, el cual experimenta un crecimiento constante, división celular, procesos de diferenciación y da origen a los diversos órganos de la parte aérea. El meristemo adulto presenta una forma convexa, radialmente simétrica y una estructura estratificada que se mantiene prácticamente constante a través del desarrollo de la planta, aspecto que conservará con ligeras variaciones a lo largo de los estadios por los que transita (meristemo vegetativo → meristemo de inflorescencia → meristemo de flor). En eudicotiledonias consta de tres capas principales de células. La capa más externa denominada L1, da origen a la epidermis, mientras que las más internas, la L2 y la L3, generan los tejidos centrales de las hojas y del tallo durante la etapa vegetativa. Así mismo el SAM, se ha dividido en tres zonas citológicas distinguibles: una Zona Central (CZ), la Zona Periférica (PZ) y la Zona Medular (RZ), que se encuentra debajo de las dos anteriores, cuyas células se dividen rápidamente, y dan lugar a los tejidos del tallo o del escapo aéreo (Figura 1: a y b) (Bowman y Eshed 2000; Sharma y Fletcher 2002).

Las células de la CZ son grandes, representan un reservorio celular caracterizadas por presentar una baja actividad mitótica. Sin embargo, cuando esta división celular ocurre, se

presenta de forma asimétrica, originando células grandes y pequeñas, estas últimas se incorporan a la PZ del meristemo. Las células de la PZ se dividen más rápido y conforme proliferan se alejan de la PZ, generando los meristemos que darán lugar a los órganos laterales y que terminan diferenciándose (Bowman y Eshed 2000; Sharma y Fletcher 2002).

1.3.1. Origen y mantenimiento del SAM

Utilizando técnicas histológicas y marcadores moleculares se ha descrito que el SAM se origina desde estadíos embrionarios muy tempranos y se va definiendo conforme avanza el desarrollo del embrión (Long y Barton 1998; Aida *et al.* 1999).

Uno de los transcritos que se expresa más temprano en las células que darán origen al SAM es el gen homeobox *WUSCHEL* (*WUS*), el cual juega un papel importante en el mantenimiento estructural y funcional del meristemo. Cuando este gen es mutado, el meristemo se consume rápidamente y se observan importantes defectos en la CZ, por lo que se requiere para mantener la identidad de las células de la CZ del SAM (Gallois *et al.* 2002; Sharma y Fletcher 2002; Jonsson *et al.* 2005). Además, la sobreexpresión de *WUS* es suficiente para convertir células de los primordios de órganos y del meristemo de la raíz en células con características de la CZ del SAM (Gallois *et al.* 2004). El patrón de expresión de *WUS* es muy dinámico a lo largo del desarrollo del embrión. Inicialmente se expresa en las células apicales subepidermales del embrión en estadio de 16 células (Mayer *et al.* 1998), posteriormente conforme avanza el desarrollo del embrión su expresión se limita sólo a las células madre de la CZ del SAM, corroborando la importancia de *WUS* en el mantenimiento de estas células (Mayer *et al.* 1998; Jonsson *et al.* 2005).

Sin embargo, cabe destacar que la ausencia de un mecanismo que regule la actividad *WUS*, provocaría la acumulación descontrolada de células madre en los meristemas. Este mecanismo es precisamente lo que se observa en los mutantes *clv* (*clv1*, 2 y 3). Estos presentan una acumulación excesiva de células madres en el centro del SAM y adicionalmente el dominio de expresión de *WUS* se expande. Por otra parte, la expresión ectópica de *CLV3* es suficiente para reprimir la expresión de *WUS*, demostrando que los genes *CLV* funcionan reprimiendo al el gen *WUS* (Brand *et al.* 2000; Schoof *et al.* 2000).

CLV3 codifica para una proteína soluble o ligando que se produce en las capas L1 y L2 de la CZ, pero se transporta y su acción tiene efecto en las capas internas del SAM, donde un heterodímero conformado por *CLV1* y *CLV2* transducen la señal que al final reprime al gen *WUS*.

CLV1 es un receptor que pertenece a la familia treonina-serina cinasas, se expresa fuertemente en la L3 de la CZ (Figura 1c) Mientras que *CLV2* tiene un patrón de expresión más ubicuo (Clark *et al.* 1995; Clark *et al.* 1997; Fletcher *et al.* 1999; Jeong *et al.* 1999).

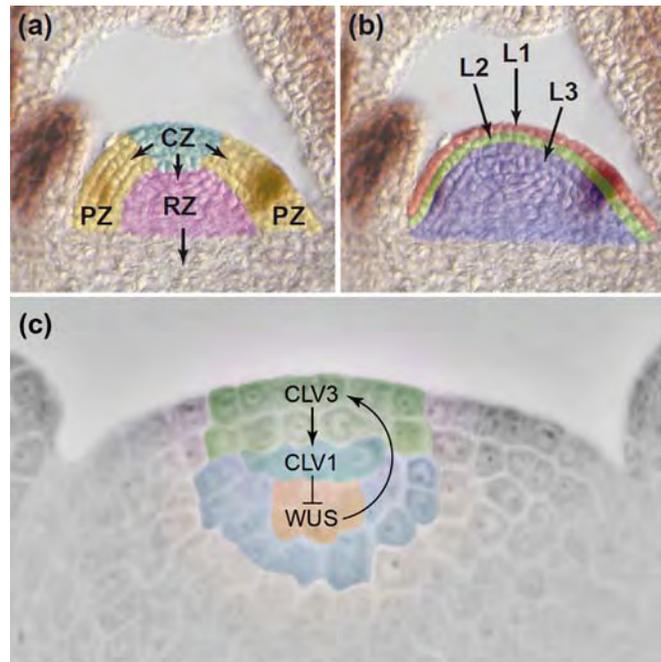


Figura 1. Estructura y mantenimiento del SAM en *A. thaliana*. (a) y (b) histología del SAM donde se observa en diferentes colores las diferentes zonas del meristemo, en (b) con la flechas se señalizan las capas (L1, L2 y L3) del meristemo. (c) Esquema que explica como es el mantenimiento de las células madre por el asa de retroalimentación CLAVATA-WUSCHEL. *CLV3* se expresa en la L1 y L2 de la CZ, mientras que el mRNA de *CLV1* se detecta solo en la L3 de la CZ y en la RZ. *WUS* se expresa en algunas células centrales de la RZ. (Tomado de: Bowman y Eshed 2000; Carles y Fletcher 2003)

La clave de este sistema, definido como un asa de retroalimentación (Figura 1c), radica en que las células ubicadas en la capa L1 secretan el ligando *CLV3* al ser estimuladas por una señal dependiente de *WUS* (Schoof *et al.* 2000). Por lo tanto, el meristemo se constituye por dos poblaciones de células: las inferiores que expresan *WUS* y que envían una señal promotora de identidad de célula madre a las células ubicadas en la parte superior de la CZ, éstas últimas células devuelven una señal vía *CLV3* para restringir la expresión de *WUS*. Cualquier aumento o disminución en el número de células madre propicia un retorno al punto de equilibrio mediada por este mecanismo de regulación (Figura 1c). El sistema parece ser sensible a los niveles de *CLV3* (Brand *et al.* 2000), debido a que el 75% de *CLV3* sintetizado en L1 se encuentra unido a su receptor *in vivo*, secuestrando el ligando y restringiendo el movimiento de *CLV3* a las capas inferiores (Trotochaud *et al.* 2000).

Otro gen necesario para el mantenimiento de las células iniciales del SAM es *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* el cual codifica para una proteína que contiene un homeodominio (Clark *et al.* 1996; Endrizzi *et al.* 1996; Cole *et al.* 2006; Scofield *et al.* 2007). En plantas mutantes *stm* se inhibe la formación del meristemo aéreo, tanto del primario durante la embriogénesis como de los meristemos secundarios que se desarrollan durante el crecimiento de la planta. Sin embargo, este efecto fenotípico parece restringirse al SAM, ya que los individuos mutantes muestran un crecimiento normal de la raíz (Clark *et al.* 1996; Endrizzi *et al.* 1996). A partir del estudio de mutantes para un alelo débil, *stm-2*, se ha sugerido que la función del gen STM se requiere además para el mantenimiento del propio meristemo vegetativo, puesto que las plantas con este alelo son capaces de formar hojas en una etapa postembrionaria, aunque finalizan su crecimiento prematuramente (Clark *et al.* 1996). El mensajero de STM comienza a detectarse desde el estadio globular medio del embrión, en las células que darán lugar al meristemo vegetativo y persiste tras la

germinación en los diferentes estadios del meristemo (meristemo vegetativo, de inflorescencia y floral). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la actividad de STM es necesaria tanto para la formación como para el mantenimiento del meristemo. El desarrollo del SAM en las plantas anuales puede clasificarse en dos etapas principales, la vegetativa y la reproductiva (Figura 2).

La importancia de la etapa vegetativa radica principalmente en el crecimiento de la planta, en la parte aérea durante esta etapa se producen las hojas y los tallos, y en la reproductiva se forman las flores. En *A. thaliana*, durante la fase vegetativa, se producen las hojas con internodos cortos y filotaxia helicoidal que dan lugar a la formación de la roseta. La coordinación de diversos procesos como la proliferación, diferenciación y la elongación celular son esenciales para la correcta formación de las hojas y cualquier otro órgano. Por lo tanto, empezar a entender la regulación de estos mecanismos da la pauta para interpretar una parte importante del desarrollo de los organismos (Micol y Hake 2003). Una vez concluida la fase vegetativa ocurre uno de los cambios más importantes durante el ciclo de vida de las plantas, que es la transición al estado reproductivo o floral.

1.4. Transición al estado reproductivo del SAM

La transición floral depende en gran medida de señales endógenas, sin embargo, puede ser promovida por las vías de respuesta a condiciones ambientales que afectan el tiempo en que el SAM deja de producir hojas de roseta y cambia a un meristemo de inflorescencia (IM) que a su vez produce meristemas florales (FM). A este proceso se le ha denominado transición a la floración y el período en que esto ocurre como “tiempo de floración” (Koorneef *et al.* 1998; Blazquez *et al.* 2001). En *A. thaliana*, la manifestación morfológica de la transición a la floración: es la emergencia del escapo o la inflorescencia desde el centro

de la roseta. Se han descrito cuatro principales vías que afectan el tiempo de floración con base en análisis genéticos: la vía del fotoperiodo, la mediada por giberelinas (GA), la vernalización y la vía autónoma (Parcy 2005; Baurle y Dean 2006).

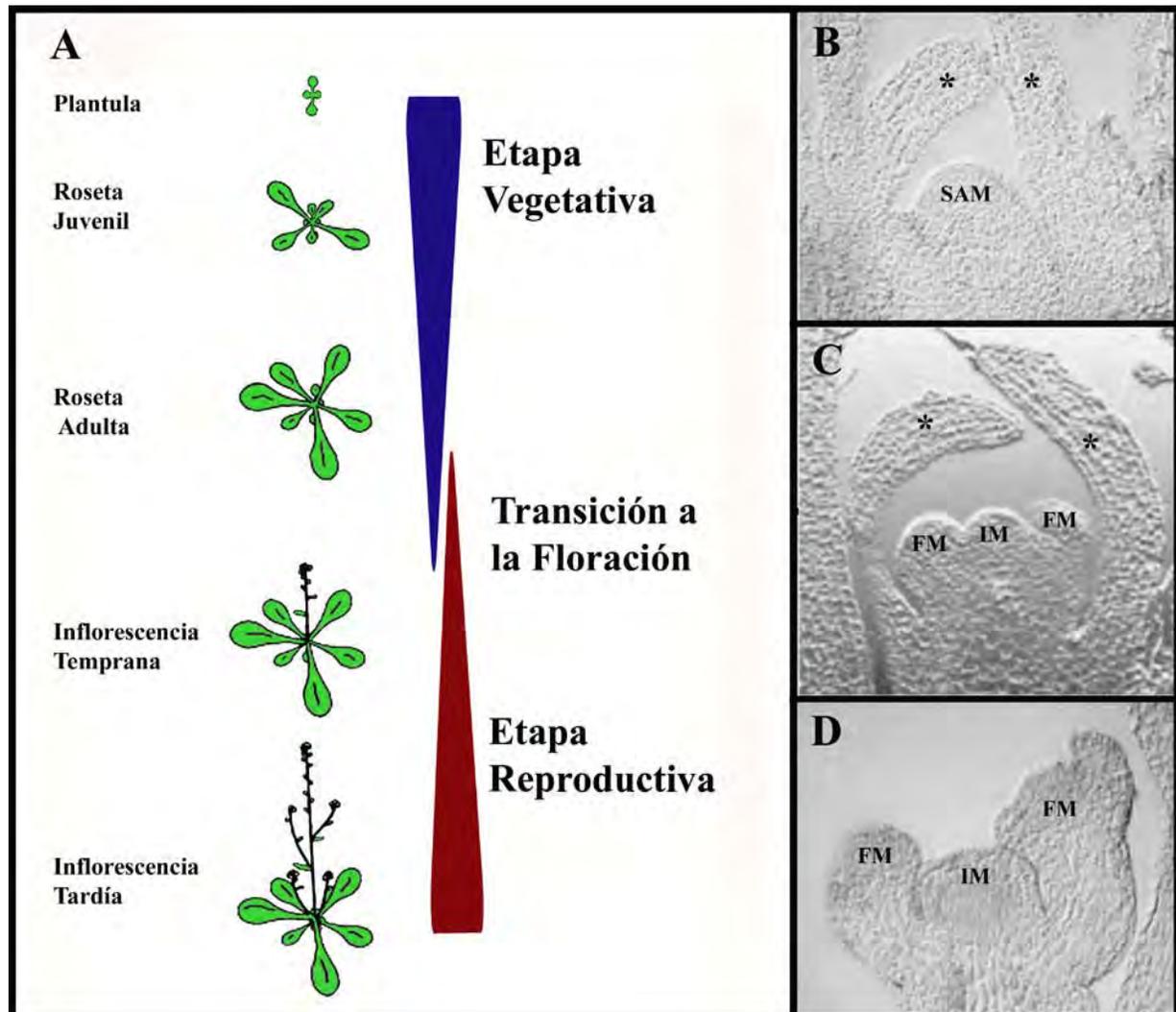


Figura 2. Etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. **A:** Cambios morfológicos en la parte aérea durante la transición floral, **B:** corte histológico del meristemo aéreo durante la etapa vegetativa donde se producen principalmente las hojas. **C:** Apariencia del meristemo aéreo cuando deja de producir hojas y cambia a la etapa reproductiva en la que se empiezan a producir meristemos florales. **D:** El meristemo aéreo durante la etapa reproductiva. SAM: Meristemo Apical del Tallo, *: primordios de hoja, IM: Meristemo de Inflorescencia FM: Meristemo de flor (Modificado de: Simpson *et al.* 1999; y Parcy 2005)

1.4.1. La duración del día como regulador del tiempo de floración

Las plantas florecen en respuesta a la duración del día o fotoperiodo, por ejemplo: *A. thaliana* florece más rápido en condiciones inductivas de luz, es decir, días largos (LD: 16 h luz/8 h oscuridad) y tardan más en florecer en días cortos (SD: 8 h luz/16 h oscuridad). Las plantas mutantes en esta vía florecen tardíamente en LD. De esta forma se describió a el gen *CONSTANS* (*CO*), que codifica para un factor de transcripción con dedos de zinc, determinante en la vía que regula la floración con respecto al fotoperiodo (Putterill *et al.* 1995).

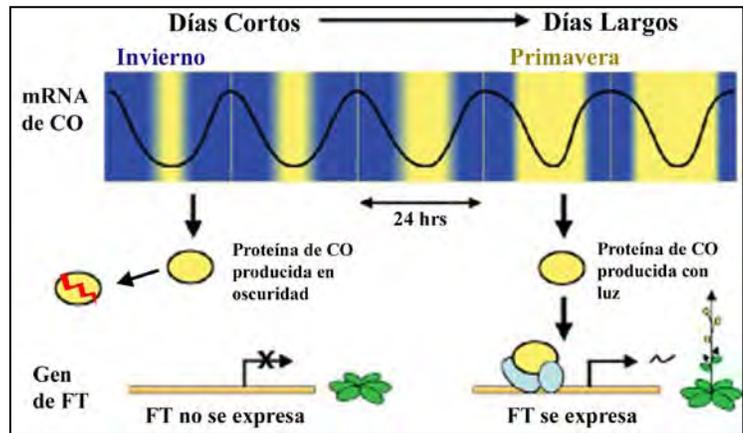


Figura 3. La duración del día promueve la floración en *A. thaliana* a través de *CO*. El mensajero de *CO* presenta su nivel de expresión más alto durante la noche en SD y en día largo su nivel más alto es al finalizar el día. Sin embargo, la proteína solo es estable en LD, de esta forma puede inducir la expresión de *FT* promoviendo la floración. (Modificado de: Putterill *et al.* 2004)

El mecanismo por el cual las plantas distinguen entre el LD del SD radica en la regulación de *CO* tanto a nivel de mRNA como de la proteína por componentes del ciclo circadiano (Mizoguchi *et al.* 2005), en condiciones de día corto el pico más alto de expresión de su mRNA es durante la fase nocturna, por el contrario, en día largo es más abundante al final del día (Valverde *et al.* 2004). Por otra parte la proteína *CO* es estable en luz y es degradada en oscuridad, por lo tanto, la proteína *CO* se acumula solo en LD lo que promueve la floración (Figura 3).

Se ha descrito que *CO* promueve la activación transcripcional de *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Figura 3) que codifica para un probable inhibidor de RAF cinasas, aunque su mecanismo no ha quedado muy claro, *FT* es considerado como el florígeno por su capacidad

de moverse desde las hojas hasta el SAM. Una vez en el SAM, FT promueven la expresión del gen *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1/AGL20*) y posteriormente a *LEAFY* (LFY), gen determinante en la transición a la floración y a su vez es un gen de identidad del meristemo de flor (Lee *et al.* 2000; Samach *et al.* 2000; Yoo *et al.* 2005). Sin embargo, FT puede promover la floración independientemente de *SOC1*, al interactuar con FD y juntos inducir la expresión directa de AP1 (Abe *et al.* 2005)

SOC1, es un factor de transcripción de la familia MADS-box, inicialmente fue descrito como un supresor del fenotipo de floración temprana promovido por la sobreexpresión de CO (Onouchi *et al.* 2000; Samach *et al.* 2000). Utilizando genética reversa, se describió que la mutante *soc1* es de floración tardía tanto en LD como en SD (Borner *et al.* 2000). Además, las plantas que sobreexpresan a *SOC1* son de floración temprana (Borner *et al.* 2000; Lee *et al.* 2000). *SOC1* se expresa en las hojas y en el SAM, sin embargo, durante la transición a la floración la expresión aumenta considerablemente y se restringe al meristemo de inflorescencia (Lee *et al.* 2000; Onouchi *et al.* 2000; Samach *et al.* 2000).

1.4.2 Las giberelinas promueven la floración

Las giberelinas (GA) son fitohormonas que se sintetizan principalmente en meristemas jóvenes (Taiz y Zeiger 2006). Existen alrededor de 125 tipos de giberelinas, pero sólo algunas son biológicamente activas. Las GA promueven diversos procesos que incluyen: la expansión de hojas, elongación del tallo, la germinación de las semillas, la floración, entre otros (Taiz y Zeiger 2006).

Las plantas mutantes en enzimas que forman parte de la vía de biosíntesis de esta hormona (por ejemplo la mutante *ga-1*), florecen tardíamente con respecto a la planta silvestre, principalmente en condiciones no inductivas, es decir, en SD (Wilson *et al.* 1992; Blazquez *et al.* 1998). Por otra parte, la aplicación exógena de GA en *A. thaliana* y en otras

plantas acelera el tiempo de floración (Wilson *et al.* 1992; Blazquez *et al.* 1998). Se sabe que las GA regulan positivamente a *SOC1* y a *LFY* (Blazquez *et al.* 1998; Moon *et al.* 2003; Eriksson *et al.* 2006), por lo que las GA promueven la floración a través de estos genes.

1.4.3. La vernalización acelera el tiempo de floración

Otra vía importante que induce el tiempo de floración es la exposición a bajas temperaturas por periodos prolongados de tiempo, denominada vernalización. En plantas invernales desempeña un papel crucial en prevenir la floración durante el invierno, posibilitando que solo ocurra en primavera. Se sabe que *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, un miembro de la familia MADS-box, es un represor importante de la floración al inhibir directamente la transcripción de *FT* y *SOC1* (Hepworth *et al.* 2002; Helliwell *et al.* 2006). Se ha observado que en plantas expuestas a periodos prolongados de frío los niveles de *FLC* disminuyen considerablemente, evitando la represión sobre *FT* y *SOC1* permitiendo la transición al estadio reproductivo (Hepworth *et al.* 2002; Helliwell *et al.* 2006).

La represión progresiva de *FLC* es resultado de un proceso epigenético mediado por la proteína VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3) la cual presenta un dominio de dedo de zinc, *VERNALIZATION2 (VRN2)* un gen homólogo del grupo Polycomb de *Drosophila* y por *VERNALIZATION1 (VRN1)* que codifica para una proteína de unión al DNA (Sung y Amasino 2004; Wood *et al.* 2006). Las proteínas del grupo de los Polycomb (PcG) son complejos multiprotéicos que modifican mediante desacetilaciones o metilaciones los dominios amino terminales de las histonas promoviendo de esta forma el silenciamiento de genes al compactar la cromatina. Los mutantes *vrn1* y *vrn2* son insensibles a la aceleración de la floración después de vernalizar como consecuencia de los altos niveles de expresión de *FLC* que permanecen. Posterior a la vernalización *VRN2* y *VRN1* promueven la dimetilación en las lisinas 9 y 27 de la HISTONA3 cercana al locus de *FLC*, lo que propicia su silenciamiento

(Levy *et al.* 2002; Bastow *et al.* 2004). Sin embargo, esta represión no es completamente estable puesto que si se eleva la temperatura en las condiciones de crecimiento de las plantas, FLC vuelve a expresarse. En este sentido se ha descrito a la proteína LIKE HETEROCROMATIN 1 (LHP1) que interactúa con la K27H3 metilada del locus de *FLC* y permite el mantenimiento de la cromatina cerrada incluso después de elevar la temperatura (Mylne *et al.* 2006; Sung *et al.* 2006), indicando que LHP1 es importante para mantener los niveles bajos de *FLC* después de la vernalización.

Es importante destacar que *FLC* juega un papel relevante en la vía de la vernalización, sin embargo, los mutantes nulos *flc* exhiben algo de respuesta a la vernalización, indicando que existen otros factores implicados en este proceso. Trabajos recientes muestran que

otros MADS-box pueden estar participando en esta vía de transición a la floración, como: los genes *FLOWERING LOCUS M* (*FLM*), *MADS AFFECTING FLOWERING 2* (*MAF2*), *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*) y *AGAMOUS-LIKE 19* (*AGL19*) los cuales son regulados por la vernalización

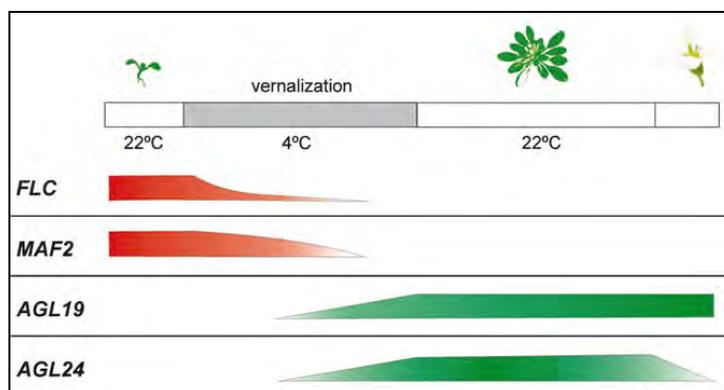


Figura 4. El efecto de la vernalización en diferentes genes MADS-box. Promotores de la floración como *AGL24* y *AGL19* requieren periodos prolongados de tiempo de exposición a bajas temperaturas para ser activados, a diferencia de *FLC* que es reprimido rápidamente (sin embargo, esta represión no es muy estable ver texto) (Tomado de: Alexandre y Hennig 2008)

independientemente de *FLC* (Michaels *et al.* 2003; Ratcliffe *et al.* 2003; Schönrock *et al.* 2006; Alexandre y Hennig 2008).

1.4.4. La vía autónoma regula la floración independientemente de señales externas

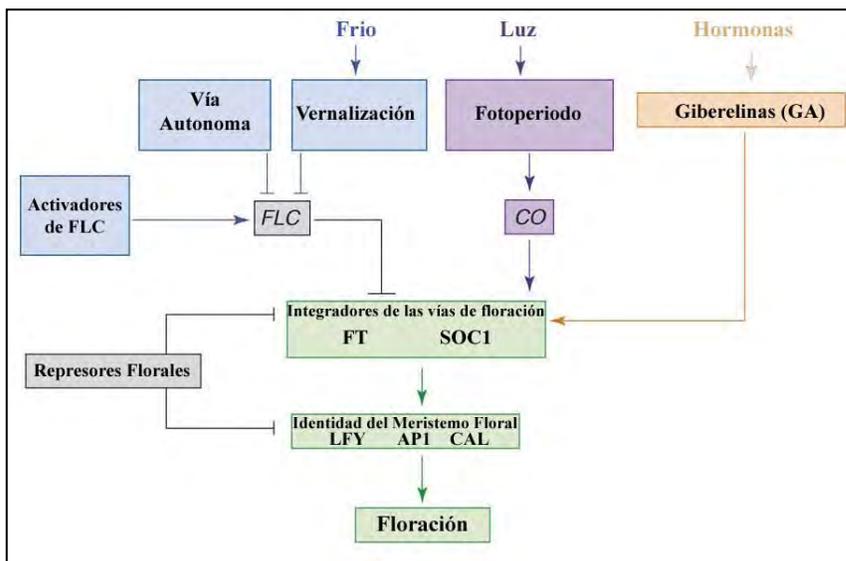
La vía autónoma es la respuesta a señales intrínsecas del desarrollo e independiente a señales externas. Hasta ahora se han identificado un grupo de siete genes pertenecientes a esta vía cuyos mutantes son de floración tardía y principalmente presentan elevados niveles de expresión del mensajero del represor de la floración *FLC*, pero que pueden ser rescatados por vernalización. Los miembros de la vía autónoma son: los genes *FCA*, *FPA* y *FLOWERING LATE KM MOTIF (FLK)* que codifican para proteínas de unión a RNA. *FY* codifica para un factor de poliadenilación que junto con el gen *FCA* participa en el procesamiento del RNA (Simpson *et al.* 2003; Marquardt *et al.* 2006). *LUMINIDEPENDENS (LD)* codifica para una proteína con un dominio homeótico (Lee *et al.* 1994) y por último, *FVE* y *FLOWERING LOCUS D (FLD)* son homólogos del complejo de desacetilasas de histonas de humano (HDAC), ambos participan en el remodelaje de la cromatina y afectan directamente el locus de *FLC* (He *et al.* 2003; Ausin *et al.* 2004). Aún no se conoce el mecanismo molecular detallado de cómo estos siete genes reprimen a *FLC*, sin embargo, no cabe duda que la reestructuración de la cromatina, así como el silenciamiento a nivel de mRNA por microRNA pueden estar participando en este proceso (Michaels 2009).

1.4.5. Integración de la transición a la floración

La transición a la floración es promovida por cada una de las diferentes vías, sin embargo, no actúan en su totalidad independientemente la una de la otra. Análisis genéticos muestran que existe una red que puede estar integrando las diferentes señales que provienen de cada vía e inducir de esta forma la expresión de los genes de identidad del

meristemo de flor (FMI, del inglés: Floral Meristem Identity) en la parte axilar del SAM e iniciar la formación de los primeros primordios florales (Long y Barton 2000).

En la literatura son tres los genes que principalmente son considerados como los integradores de la transición a la floración: *FT*, *SOC1* y *LFY*, este último además es un gen de meristemo de identidad floral (Simpson *et al.* 1999; Putterill *et al.* 2004; Parcy 2005; Baurle y Dean 2006; Blazquez *et al.* 2006; Michaels 2009). *FT* es considerado como un integrador



ya que hay evidencia genética que muestra que induce a *AP1* independientemente de promover a *LFY* (Ruiz-García *et al.* 1997).

La mutante *soc1* es de floración tardía en las cuatro condiciones demostrando su importancia como un gen

Figura 5. Esquema simplificado de las interacciones de las cuatro vías de floración. Abreviaturas: AP1, APETALA1; CAL CAULIFLOWER, CO, CONSTANS; FLC, FLOWERING LOCUS C; FT, FLOWERING LOCUS T; LFY, LEAFY; SOC1, SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (Modificado de: Roux *et al.* 2006).

integrador de la floración (Lee *et al.* 2000). Como anteriormente lo mencioné la vía del fotoperiodo promueve a *SOC1* por medio de CO y FT. La vernalización y la vía autónoma regulan positivamente a *SOC1* a través de inhibir a *FLC* y además *SOC1* es regulado directamente por factores transcripcionales tipo MYB que se inducen por GA (Blazquez *et al.* 1998; Moon *et al.* 2003), por lo que *SOC1* es determinante en la integración de las señales que promueven la transición a la floración.

Sin embargo, la represión de la floración también es necesaria durante los estadios juveniles de la planta de modo que no se de la transición precozmente. En este sentido, se ha descrito un complejo represor integrador de la floración en el que participa *FLC* que actúa junto con otro gen MADS-box, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (Hartmann *et al.* 2000; Lee *et al.* 2007; Li *et al.* 2008). *FLC* participa en la integración de las señales provenientes de la vía autónoma y de la vernalización. *SVP* es regulado negativamente por miembros de la vía autónoma y por las GA. Al igual que *FLC*, *SVP* reprime directamente la transcripción de *SOC1* y probablemente de *FT*. Se ha observado que en la mutante *svp* se suprime el fenotipo de floración tardía causado por la acción de *FLC* (Lee *et al.* 2007; Li *et al.* 2008). Recientemente se ha descrito que *FLC* y *SVP* interactúan *in vivo* formando un complejo represor integrador de la floración (Li *et al.* 2008).

La transición a la floración es un proceso del desarrollo de las plantas que conlleva la producción de flores y por lo tanto a la determinación del meristemo, sugiriendo ampliamente que el tiempo de floración y la determinación del meristemo de flor están estrechamente relacionados.

1.5. Interrelación entre los meristemas de inflorescencia y floral

Durante la transición a la floración ocurren cambios morfológicos debidos al incremento en la división celular que promueven la formación de los meristemas de flor en los flancos del SAM y se induce la expresión de los genes de identidad del meristemo de flor (FMI) en estos flancos. *LFY*, un factor de transcripción solo encontrado en el reino de las plantas, participa de manera importante en este proceso (Schultz y Haughn 1991; Weigel *et al.* 1992; Maizel *et al.* 2005).

LFY se expresa en las hojas durante la fase vegetativa, sin embargo, durante la transición a la floración es inducido directamente por *SOC1* y *AGL24* (Liu *et al.* 2008) y su patrón de expresión cambia y se relocaliza en los flancos del SAM (Moon *et al.* 2003), y mantiene su expresión en todo el primordio floral hasta el estadio tres y posteriormente persiste solo en el centro de la flor (Blazquez *et al.* 1997; Hempel *et al.* 1997). La mutante *lfy* presenta hojas y tallos secundarios en lugar de flores (Schultz y Haughn 1991; Weigel *et al.* 1992) y la

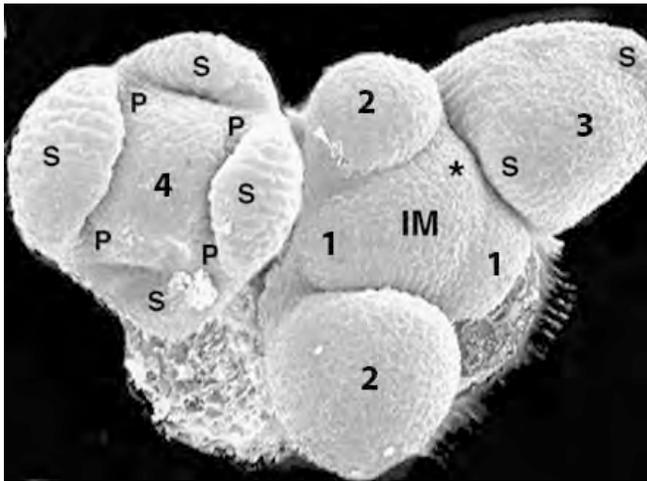


Figura 6. Micrografía electrónica de barrido del SAM de *A. thaliana*. Se muestra en el centro, el meristemo de inflorescencia (MI) y en los flancos varios estadios de primordios florales, indicados con números. El asterisco señala la formación de un nuevo primordio. Además se muestran los primordios de sépalos (S) y pétalos (P). (Tomado de: Blazquez *et al.* 2006)

sobreexpresión ectópica de *LFY* induce la formación de flores en los meristemas laterales (Weigel y Nilsson 1995), confirmando que *LFY* es necesario y suficiente para el establecimiento del meristemo de flor.

Sin embargo, existen otros factores que participan en la especificación del meristemo de flor, puesto que en el mutante de *lfy* eventualmente se forman estructuras parecidas a flores (Huala y Sussex 1992; Weigel *et al.* 1992). Es el caso de *APETALA1* (*AP1*) y *CAULIFLOWER* (*CAL*) ambos genes MADS-box, *AP1* y *LFY* muestran funciones parcialmente redundantes en la determinación del meristemo de flor, en la mutante *ap1* las flores son anormales con características de inflorescencia en lugar de flores únicas, y la doble mutante *lfy ap1* muestra una conversión completa de flores en tallos (Huala y Sussex 1992; Bowman *et al.* 1993). Cuando se sobreexpresa ectópicamente *AP1*, el meristemo de inflorescencia se determina prematuramente y se desarrollan flores terminales (Mandel y Yanofsky 1995a).

El conjunto de estos resultados muestran que *AP1* es suficiente en la determinación del meristemo de flor, pero no es absolutamente necesario (Mandel y Yanofsky 1995a).

CAL es homólogo a *AP1* y también tiene redundancia funcional con éste (Alvarez-Buylla *et al.* 2000; Martínez-Castilla y Alvarez-Buylla 2003; Alvarez-Buylla *et al.* 2006). La mutante *cal* no muestra fenotipo aparente, pero la doble mutante *ap1 cal* presenta un fenotipo que asemeja a una coliflor, por la gran cantidad de inflorescencias que desarrolla (Bowman *et al.* 1993; Kempin *et al.* 1995; Ferrandiz *et al.* 2000). A diferencia de *AP1*, la sobreexpresión de *CAL* no afecta la determinación del meristemo de inflorescencia, probablemente porque la proteína de *CAL* no puede interactuar con las mismas proteínas con las que interactúa *AP1* (Alvarez-Buylla *et al.* 2006).

Tanto *AP1* como *CAL* son inducidos directamente por *LFY* en los meristemos florales (William *et al.* 2004), pero además, *AP1* se induce independientemente de *LFY*, por un complejo proteico formado por *FT* y *FD* (Ruiz-García *et al.* 1997; Abe *et al.* 2005). Otro blanco importante de *LFY* es *LATE MERISTEM IDENTITY1 (LMI1)* un factor de transcripción, con función de FMI (William *et al.* 2004), que junto con *LFY* activan la expresión de *CAL* en el meristemo de flor (Saddic *et al.* 2006).

Durante la fase reproductiva de *A. thaliana*, el meristemo de inflorescencia (IM) indeterminado da origen a numerosos meristemos florales (FM) determinados, por lo que existe una estrecha relación entre estos meristemos. Se ha descrito ampliamente que hay una mutua represión entre los genes del meristemo de inflorescencia y los de identidad del meristemo de flor de forma que no invadan sus respectivos dominios (Figura 7) (Benlloch *et al.* 2007). Por ejemplo, *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)*, homólogo a *FT* pero con un papel antagónico, se expresa en la zona central del IM pero la proteína para la que codifica se ha observado en todo el IM (Conti y Bradley 2007). Experimentalmente se sabe que, en la

mutante *tfl1* el IM se determina prematuramente y por lo tanto se desarrollan flores

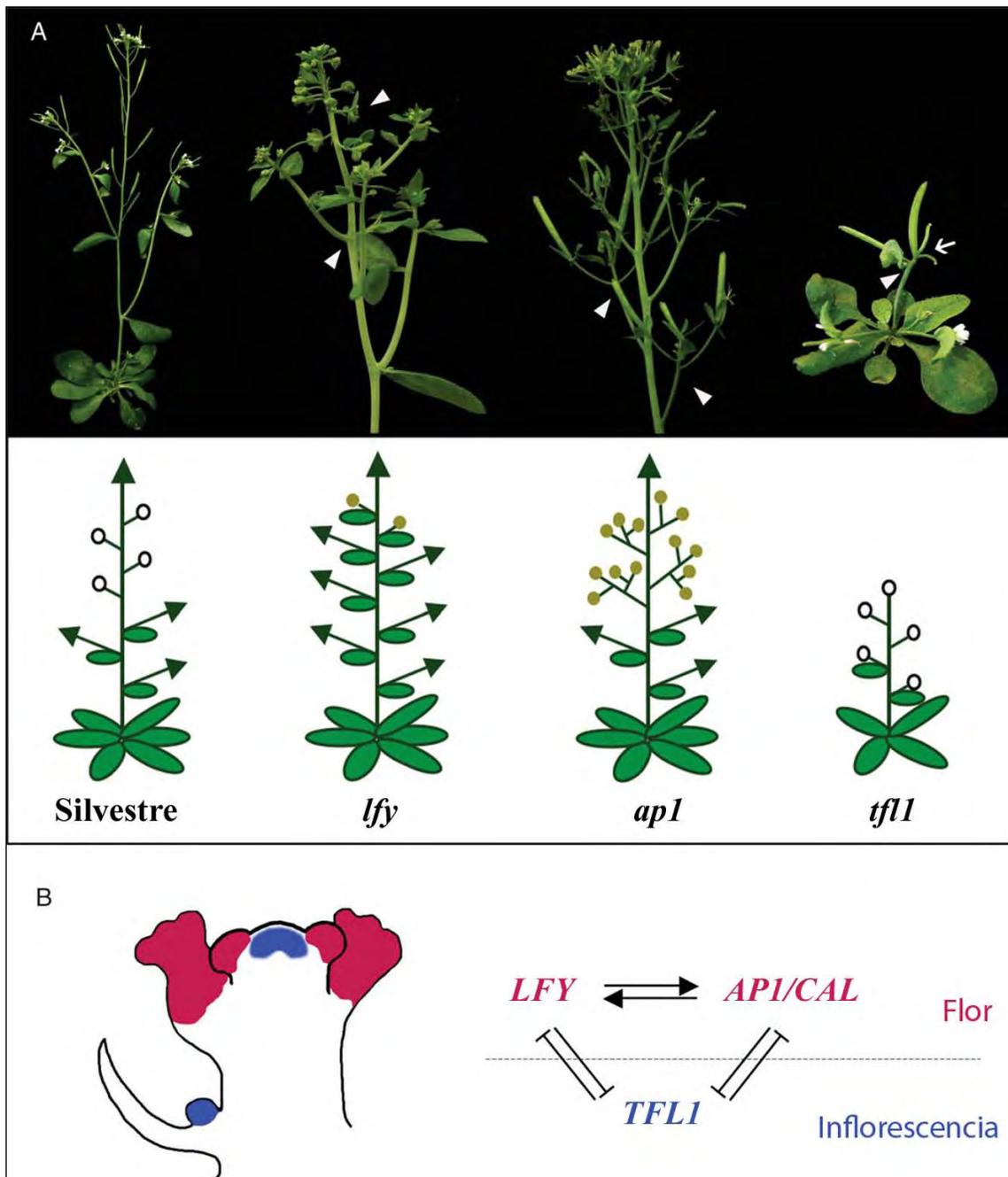


Figura 7. Interrelación entre el meristemo de inflorescencia y el meristemo de flor. **A)** Arriba, fenotipo de la planta silvestre comparado con los mutantes *lfy*, *ap1* y *tfl1*. Abajo la representación esquemática de los fenotipos respectivos, las puntas de flecha representan meristemos indeterminados, los círculos vacíos representan meristemos determinados y los círculos llenos flores con características de inflorescencia. **B)** Esquemáticamente se muestran los patrones de expresión de *LFY*, *AP1*, *CAL* (en rojo) y de *TFL1* (azul), así como las interacciones entre estos genes. (Tomado de: Benlloch *et al.* 2007)

terminales en lugar de inflorescencias (Shannon y Meeks-Wagner 1991; Alvarez *et al.* 1992; Shannon y Meeks-Wagner 1993), esto es consecuencia de la expresión ectópica de *LFY* y *AP1* en el MI (Bradley *et al.* 1997; Conti y Bradley 2007), indicando que *TFL1* excluye la expresión de *LFY* y *AP1* del IM (Figura 7). Además, la sobreexpresión constitutiva de *TFL1* promueve la formación de rosetas más grandes y de inflorescencias sumamente ramificadas, así como la represión temprana de *LFY* y *AP1* en el SAM (Ratcliffe *et al.* 1998). Sin embargo, la represión es mutua, porque *TFL1* es regulado negativamente en plantas que sobreexpresan *AP1* (Liljegren *et al.* 1999). Las evidencias demuestran la importancia de *TFL1* en el establecimiento del meristemo de inflorescencia.

Por otra parte, *FRUITFULL* (*FUL*), un MADS-box homólogo a *AP1* y *CAL*, se expresa durante la transición a la floración y es excluido del meristemo de flor por *AP1* permaneciendo en el MI, aunque su expresión reaparece posteriormente en el primordio del carpelo (Mandel y Yanofsky 1995b). El mutante *ful* no exhibe desórdenes en los meristemas de inflorescencia y de flor, pero muestra importantes defectos en el desarrollo del fruto (Gu *et al.* 1998). Sin embargo, en la triple mutante *ap1 cal ful* se exagera el fenotipo observado en la doble mutante *ap1 cal*, mostrando hojas y tallos en lugar de flores (Ferrandiz *et al.* 2000). Probablemente, este efecto se debe a la invasión de *FUL* en el meristemo de flor por la pérdida de *AP1* y *CAL*, y reemplaza parcialmente la función de estos últimos debido a su parecido, por lo tanto en la triple mutante se elimina casi todo lo que puede complementar parcialmente la función de *AP1* (Ferrandiz *et al.* 2000; Blazquez *et al.* 2006).

AGL24, como lo mencioné antes es un promotor de la floración y participa en la vía de la vernalización. *AGL24* interactúa físicamente con *SOC1* activando directamente la expresión de *LFY* durante la transición a la floración (Yu *et al.* 2002; Michaels *et al.* 2003; Liu *et al.*

2008). Sin embargo, cuando *AGL24* se sobreexpresa ectópicamente en el meristemo de flor, se forman flores con características de inflorescencias (Yu *et al.* 2004). Evidencia reciente muestra que se requiere la exclusión de genes como *AGL24*, *SVP* y *SOC1* del meristemo de flor por *LFY* y *AP1*, manteniéndose de esta forma la identidad floral (Yu *et al.* 2004; Liu *et al.* 2007).

El programa de desarrollo de los órganos florales consiste en la expresión regional de ciertos genes (similares en función a los genes homeóticos de animales) que instruyen a las células en la formación de un determinado órgano floral.

1.5.1. Especificación de los órganos florales: El modelo ABC y la determinación del meristemo de flor

El primordio floral puede dividirse en cuatro regiones concéntricas, denominadas *verticilos*, que coinciden con las células primordiales que darán lugar a sépalos, pétalos, estambres y pistilos. El primordio floral a simple vista está constituido por un grupo homogéneo de células, aparentemente sin diferencias morfológicas. Sin embargo, durante el desarrollo existen diferencias a nivel de expresión génica que permiten el establecimiento y formación de cada órgano floral en su respectivo sitio, tal como lo propone el modelo ABC (Coen y Meyerowitz 1991; Taiz y Zeiger 2006).

La combinación del análisis genético de mutantes deficientes en la formación de determinados órganos, junto con el análisis molecular de los genes afectados en cada mutante, permitió proponer el modelo ABC del desarrollo de los órganos florales (Coen y Meyerowitz 1991). Este modelo explica cómo la actividad de los genes A (*AP1* y *AP2*) establece la identidad de los sépalos en el primer verticilo y, junto con la actividad de los genes B: *APETALA3* y *PISTILLATA* (*AP3* y *PI*) la de pétalos en el segundo verticilo. De forma

similar, B y C *AGAMOUS (AG)* especifican la identidad de estambres en el tercer verticilo, mientras que la actividad C por sí sola establece la identidad del carpelo. También se han identificado los genes *SEPALLATA1, 2, 3 y 4* que forman heterodímeros con otras proteínas para que estas puedan llevar a cabo su actividad (Pelaz *et al.* 2000; Pelaz *et al.* 2001; Melzer *et al.* 2009). La expresión de A impide la de C y viceversa. Por esta razón, en un mutante sin actividad de tipo A, la expresión de genes de tipo C se extiende a todos los verticilos externos y las flores de este mutante contienen la secuencia de órganos: pistilo, estambres, estambres, pistilo (Coen y Meyerowitz 1991).

Cabe recordar la importancia de *LFY* en la determinación del meristemo de flor que junto con *WUS* induce la expresión de *AG* en los dos verticilos interiores. *WUS* es requerido para el mantenimiento de las células troncales del meristemo. La activación de *AG* reprime la transcripción de *WUS* en el centro del primordio floral, por lo que la represión de este gen es necesaria para la determinación del meristemo, de tal forma que las células indiferenciadas del meristemo de flor se agotan (Lenhard *et al.* 2001; Lohmann *et al.* 2001).

Como se ha visto, la especificación del meristemo de inflorescencia, el de flor, así como los órganos florales depende en gran medida del antagonismo que hay entre cada una de las señales pertenecientes a cada meristemo, y cuando se rompe este balance ocurren cambios morfogénéticos que alteran la especificación de éstos. Varios genes de la familia MADS-box están involucrados, indicando el papel preponderante de esta familia en la modulación de diversos procesos de desarrollo y en particular en el comportamiento celular y homeostasis de los meristemos de *A. thaliana*.

1.6. Familia de Genes MADS-box

Los genes MADS-box constituyen una extensa familia de factores de transcripción, tan solo en *A. thaliana* se han descrito más de 100 miembros (Martinez-Castilla y Alvarez-Buylla 2003; Parenicova *et al.* 2003). Presentan un dominio conservado entre todos los miembros de la familia, por el cual se adoptó el acrónimo MADS por el descubrimiento de los primeros cuatro genes descritos en diferentes organismos: *MCM1* (de *Saccharomyces cerevisiae*), *AGAMOUS* (de *A. thaliana*), *DEFICIENS* (de *Antirrhinum majus*) y *SRF* (*Serum Response Factor* de Humano) (Schwarz-Sommer *et al.* 1990).

En plantas se han clasificado en dos linajes principales de genes MADS-box: los de tipo I y los de tipo II (Alvarez-Buylla *et al.* 2000; Martinez-Castilla y Alvarez-Buylla 2003). Las proteínas MADS tipo II, presentan una estructura modular denominada MIKC por sus cuatro regiones características: la región M (dominio MADS) que participa en la unión al DNA; la región I (Intermediaria); el dominio K (Keratine-like) que interviene en las interacciones proteína-proteína y por último, está la región C (Carboxilo terminal) que puede ser importante en determinar la especificidad de las interacciones entre proteínas, además, es la región menos conservada entre los MADS tipo II (Riechmann *et al.* 1996a; Riechmann *et al.* 1996b; Riechmann y Meyerowitz 1997; Ng y Yanofsky 2001). En plantas, a los genes MADS-box también se les llama *AGAMOUS-LIKE (AGL)*.

Las proteínas con dominio MADS reconocen una secuencia consenso en el DNA, conocida como la caja CArGT. Estas proteínas pueden actuar en homodímeros, en heterodímeros y/o tetrámeros para formar complejos en los cuales las proteínas accesorias trabajan como cofactores que probablemente dirigen la especificidad reguladora del complejo (Shore y Sharrocks 1995; Messenguy y Dubois 2003). Actualmente, mediante experimentos de dos híbridos en levadura, se conocen todas las probables interacciones

proteína-proteína entre los miembros de esta familia (de Folter *et al.* 2005). Conocimiento que puede ayudar ampliamente en entender qué complejos de MADS-box pueden estar participando en los diferentes procesos de desarrollo en que estén involucrados.

2. Antecedentes

Análisis filogenéticos muestran que el gen *AGL19* pertenece al clado de *SOC1* y comparte aproximadamente un 70% de similitud con *AGL14*, miembro del mismo clado (Alvarez-Buylla *et al.* 2000; Martínez-Castilla y Alvarez-Buylla 2003). Ambos genes se expresan en toda la planta y de forma más abundante en la raíz (Villajuana-Bonequi 2006). La mutante *agl14-1* es de floración tardía. Sin embargo, la mutante *agl19-1* no presenta retraso en el tiempo de floración y no muestra un fenotipo diferente al silvestre en las flores (Schönrock *et al.* 2006). Por otra parte, el alelo nulo *agl19-3* (ver sec. 5. Materiales y métodos) muestra un incremento en el tamaño de las flores, además, se observa una disminución en la longitud de las hojas de roseta, pero, tampoco es de floración tardía. (Villajuana-Bonequi 2006).

Sin embargo, la sobreexpresión constitutiva de *AGL19* (*35S::AGL19*), es claramente de floración temprana tanto en LD como en SD (Figura 8) (Blanco-Jarvio 2006; Schönrock *et al.* 2006). *AGL19* es regulado positivamente durante la vernalización por un proceso de regulación epigenético, por lo que es considerado como un

gen promotor de la floración. Sin embargo, *AGL19* a diferencia de *AGL24* no regula los niveles de expresión de *SOC1*, sugiriendo que actúa independientemente de *SOC1* (Schönrock *et al.* 2006). *FLC* interactúa con la caja *CARG* de *SOC1* y de esta forma reprime su

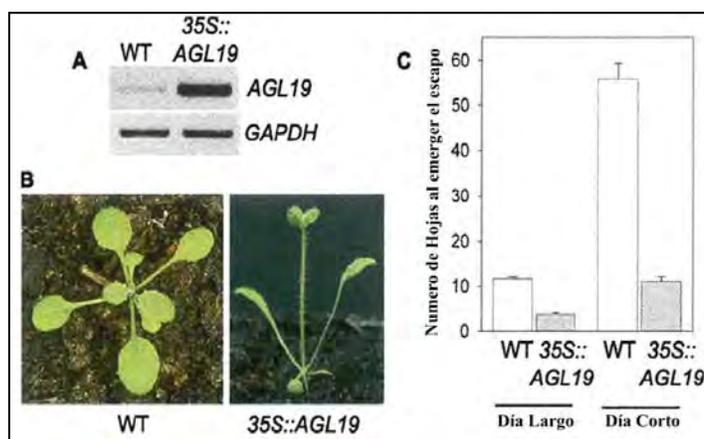


Figura 8. La sobreexpresión de *AGL19* acelera el tiempo de floración. **A)** la sobreexpresión de *AGL19* en plantas crecidas en LD de 10 DPS. **B)** Floración temprana de la planta *35S::AGL19* crecidas en LD de 20 DPS. **C)** La gráfica muestra la aceleración en el tiempo de floración medido por el número de hojas de las plantas *35S::AGL19* (barras grises) en comparación a WT (barras blancas) tanto en LD (izq.) como SD (der.). (Tomado de: Schönrock *et al.* 2006)

transcripción (Hepworth *et al.* 2002). En *AGL19*, la secuencia de la caja CARG de su promotor difiere en un nucleótido que es esencial para la unión de FLC, tal como sucede en el promotor de *SOC1*. Por lo que, FLC no puede reprimir a *AGL19* (Schönrock *et al.* 2006). Evidencia genética fortalece esta aseveración puesto que en la doble mutante *agl19-1 flc* presenta un efecto aditivo en respuesta a la vernalización (Schönrock *et al.* 2006).

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) han demostrado que en el locus del gen de *AGL19* se encuentra enriquecido con la marca de silenciamiento de la cromatina H3K27me3, pero posterior a la vernalización esta marca disminuye considerablemente (Schönrock *et al.* 2006). Por el contrario, la cromatina de FLC posterior a la vernalización se enriquece no solo con H3K27me3 si no también con la marca represiva H3K9me2 (Bastow *et al.* 2004; Sung y Amasino 2004; Sung *et al.* 2006). En contraste, la marca H3K9me2 no se

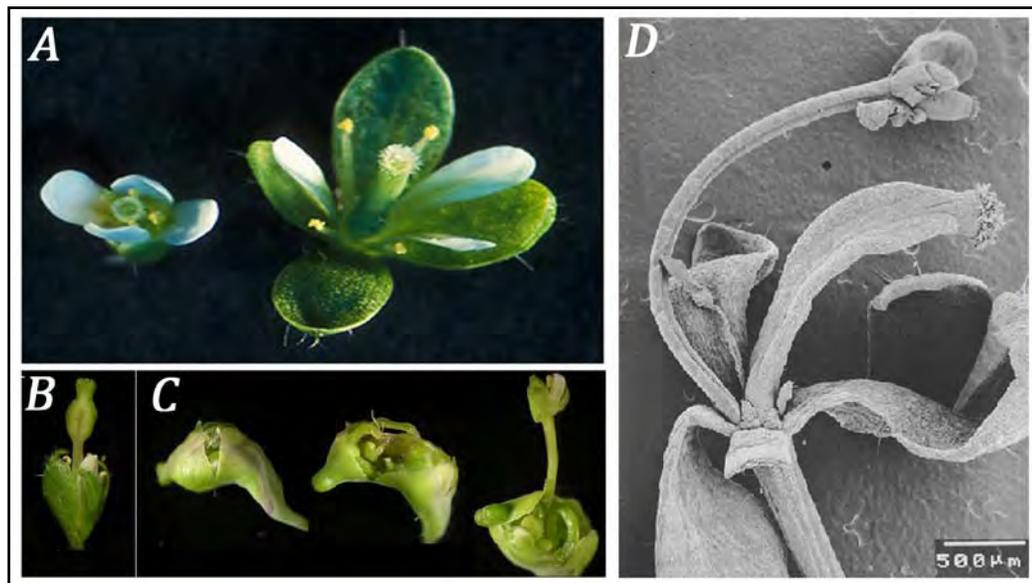


Figura 9. La sobreexpresión de *AGL19* causa reversión floral. **A)** Comparación entre una flor silvestre (izquierda) y una flor de la línea *35S::AGL19* (derecha) en condiciones de LD. **B)** Flor de una planta *35S::AGL19* en condiciones de SD en donde se observa el carpelo elongado, **C)** este mismo carpelo se muestra a lo largo del tiempo, eventualmente se abre y surge una nueva inflorescencia. **D)** Microscopía electrónica de barrido de una flor de la planta *35S::AGL19* en condiciones de SD, en donde se muestra una flor secundaria en la axila de los órganos de las flores (fotografías tomadas de Blanco-Jarvio, 2006).

ha encontrado en la cromatina de *AGL19*. La marca H3K27me3 la lleva acabo un complejo represor Polycomb (PRC2-like), constituido por EMF2, CLF/SWN, FIE, y MSI1 (Schönrock *et al.* 2006). Mientras que este tipo de marca en *FLC* lo hace el complejo de VRN2, CLF/SWN, FIE, y VIN3 (Wood *et al.* 2006).

Algunas líneas de 35S::*AGL19* caracterizadas previamente en el laboratorio presentan reversiones florales. En LD las flores de estas plantas muestran sépalos grandes parecidos a hojas y en la mayoría de los casos presentan tricomas compuestos, los cuales sólo se encuentran en hojas, en algunos casos muestran filotaxia helicoidal típica del crecimiento de inflorescencia (Blanco-Jarvio 2006). En SD se observa una reversión más evidente puesto que las plantas, además, presentan flores secundarias en las axilas de los órganos de las flores y en otros casos el carpelo se elonga y posteriormente surgen una nueva inflorescencia de su interior (Blanco-Jarvio 2006) sugiriendo que no se está determinando el meristemo (Figura 9).

De forma similar, se han observado fenotipos de reversión floral en plantas 35S::*AGL24* (Yu *et al.* 2004). Como se mencionó anteriormente *AGL24* es excluido del meristemo de flor, sin embargo, cuando se sobreexpresa en todo el SAM ocurre esta reversión. Fenotipos similares se observan en plantas mutantes *ap1* y *lfy*, donde *AGL24* extiende su dominio de expresión hacia el FM, indicando que *AGL24* es reprimido en el FM por *AP1* y *LFY*, de esta forma *AGL24* participa en el establecimiento de la identidad del meristemo de inflorescencia (Yu *et al.* 2004). A diferencia de *AGL24* datos preliminares de nuestro laboratorio muestran que *AGL19* se expresa fuertemente en el meristemo de flor (Perez-Ruiz en proceso).

En este trabajo se evaluó el papel de *AGL19* durante el tiempo de floración y el desarrollo del meristemo de flor.

3. Hipótesis

Si la sobreexpresión de *AGL19* reprime la expresión de *LFY* y/o *AP1*, esta regulación negativa provoca la reversión parcial del meristemo floral a un meristemo de inflorescencia.

4. Objetivos

4.1. General

Determinar el efecto de la sobreexpresión de *AGL19* en el tiempo de floración y en el establecimiento de la identidad del meristemo apical de *A. thaliana*.

4.1.1. Particulares

- Determinar si existe una correlación entre la intensidad del fenotipo observado en cinco líneas independientes de *35S::AGL19* con sus niveles de sobreexpresión.
- Analizar si existe un rescate de fenotipo floral en la cruce *35S::AGL19* x *35S::AP1* y determinar el tiempo de floración de esta cruce.
- Analizar la expresión de algunos genes que participan en el tiempo de floración y en el establecimiento de los meristemas en las líneas de sobreexpresión y mutantes de *AGL19*.
- Analizar la expresión de *AGL19* en plantas mutantes y de sobreexpresión de *AGL14*, *SOC1* y *AGL24* en LD y bajo tratamiento de vernalización.

5. Materiales y Métodos

5.1 Plantas y condiciones de crecimiento

Se utilizaron cinco líneas independientes de sobreexpresión de *AGL19* bajo la acción del doble promotor viral 35S (9.3.1, 10.4.6, 16.4.3, 23.8.5 y 25.8.8) y se utilizaron dos alelos mutantes de *AGL19* por inserción de T-DNA: SALK_000234, la cual llamaremos *agl19-3*, y SALK_578786 denominada *agl19-1* (Schönrock *et al.* 2006). El mutante de *AGL14* por inserción del transposón En1, *wagl14.5-1* (Ortiz-Moreno 2002; Villajuana-Bonequi 2006). Las líneas de sobreexpresión 35S::*AGL14* genómica 9. T₄ y la línea 35S::*AGL14* de cDNA 4.3 cuyas construcciones fueron generadas por Nayelli Marsch en el laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas; el mutante nulo *soc1-3* por inserción de T-DNA (SALK_138131) y la línea que sobreexpresa a *SOC1: soc-101D* (Lee *et al.* 2000). La mutante nula *agl24-1* (Michaels *et al.* 2003) y la 35S::*AGL24* (Yu *et al.* 2002). En todos los casos el fondo en el que se encuentran es en el ecotipo Columbia.

Previamente a cualquier experimento se esterilizaron y estratificaron con la finalidad de sincronizar el metabolismo y la germinación de las semillas, , agregándoles 0.5 mL de cloro al 60 % durante 5 min en agitación a temperatura ambiente (TA), posteriormente, se lavaron durante ~2 min de 3 a 4 veces con 1 mL H₂O estéril, por último se agrego 1 mL de agarosa al 0.2 % y se dejaron a 4 °C durante 48 hrs.

Para el experimento de vernalización, las plantas se esterilizaron como anteriormente fue descrito, sin embargo, se dejaron toda la noche a temperatura ambiente; al día siguiente se sembraron en cajas petri cuadradas con medio MS al 0.2X, sacarosa 1 % y agar 1 % se dejaron en la oscuridad por 60 días a 4 °C. Transcurridos 58 días se estratificaron las semillas control (sin vernalizar), dos días después y se sembraron de igual forma. Ambos

grupos de plantas (vernalizadas y sin vernalizar) se colocaron en condiciones de LD a ~22 °C durante 11 DPS, transcurrido este tiempo se separó la parte aérea de la raíz y se colocaron en N₂ líquido para la posterior extracción del RNA total.

5.2. Análisis del tiempo de floración

Las semillas, previamente estratificadas, se sembraron directamente en suelo comercial (SunGRO Metro-mix 200, Scotts, Inc.) y se colocaron a ~22 °C con luz blanca fluorescente en fotoperiodo de día largo (LD, 16 h luz/8 h luz) y se cuantificó el número de días en que el escape alcanza 1 cm de alto, además, se cuantificó a este mismo tiempo el número de hojas de roseta y caulinares de cada planta.

5.3. Extracción de RNA

Las muestras previamente congeladas con nitrógeno líquido, se muelen hasta formar un polvo homogéneo, se agrega 1 mL de TRIZOL y se agita con vortex hasta formar una mezcla homogénea, posteriormente se agregan 0.2 mL de cloroformo, se centrifuga a 12,000 rpm a 4 °C por 10 min. Posteriormente se colecta el sobrenadante y se precipita el RNA agregando 1 mL de isopropanol, se centrifuga nuevamente a 12,000 rpm 4 °C por 10 min. Después se descarta el sobrenadante y la pastilla se lava con etanol 70 %, se centrifuga a 12,000 rpm y se desecha el sobrenadante. Por último, la pastilla se resuspende en 30 µL de agua estéril.

5.4. RT-PCR semicuantitativa

A partir de 1 µg/µL de RNA se realizó una retrotranscripción usando la enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase de Invitrogen™ siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente se realizaron las PCR para diversos genes utilizando los oligos y las condiciones listadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación de los oligos utilizados en las RT-PCR con sus respectivas TM y número de ciclos utilizados.

Gen	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Tamaño	TM (°C) y Núm. Ciclos
<i>AGL14</i>	GTAGAAAGATATCAAAAAGCGAA	ACACTTCAAAAAGTTTCCTCC	458 pb	58 y 30x
<i>AGL19</i>	GAGACGAAACATCTGGATTG	GCATCATCACAATCAACGT	285 pb	58 y 30x
<i>AGL24</i>	GTCTTCATGCAAGTAACATCAA	GATCCAGCAGAGTTGACTTCGATGGA	497 pb	60 y 30x
<i>AP1</i>	GCACCTGAGTCCGACGTC	CCTTGGCTGCTTCGCCGC	524 pb	60 y 30x
<i>CO</i>	GAGTATGGACTACAAATTCAC	GATAACAGTAACACAACCTCAG	354 pb	58 y 30x
<i>FLC</i>	TTCTCCAAACGTCGCAACGGTCTC	GAGATGTCACCTGCTGGACAAATC	492 pb	60 y 30x
<i>FT</i>	CCTGCTACAACCTGGAACAACCTTT	CGAGTAACGAACGGTGATGATGCCTATA	368 pb	60 y 30x
<i>LFY</i>	TCATTTGCTACTCTCCGCCGCT	CTAAAGACCGTGGCGAAAAATG	453 pb	64 y 35x
<i>SOC1</i>	TGAGGCATACTAAGGATCGAGTCAG	GCCCAAGTTCTGAAGTAGAGACGC	399 pb	58 y 25x
<i>SVP</i>	CAGATCAGGAAGATCGACAACGC	TCCTCTCATTTGCCTTAGTCGG	321 pb	64 y 30x
<i>TFL1</i>	GAATATGGGAACTAGAGTGAT	TTAACGCACAAAGAGAAACCG	512 pb	58 y 30x
<i>TUB2</i>	AGGACTCTCAAACCTACTACC	AACTGCCGATGAAGAAGGTGA	668 pb	62 y 25x

5.5. Northern blot

Se extrajo el RNA total de la parte aérea de las líneas de sobreexpresión, mutantes y plantas silvestres de 14 DPS. Se cargaron 5µg de cada uno de los RNA totales en un gel de agarosa al 1.2 % y formaldehído al 4 % en MOPS. Se transfirió el RNA a una membrana de nylon que posteriormente se hibridó con una sonda específica para AGL19.

Se utilizó como sonda una secuencia específica de 416 pb de la región 3' del gen AGL19 la cual fue amplificada con los oligos: "AGL19 F 430" (5'-GAGACGAAACATCTGGATTG-3') y "AGL19 R 430" (5'-CTTACAACCTTCTCAAAAAGAAT-3'). La sonda fue marcada con ³²P siguiendo el protocolo de "DNA labelling beads" (Amersham Biosciences). Se usó como control de carga el RNA ribosomal.

6. Resultados

6.1. El fenotipo causado por la sobreexpresión de *AGL19* es dosis dependiente

En el laboratorio de Genética molecular, desarrollo y evolución de plantas se cuenta con cinco líneas homocigotas de sobreexpresión de *AGL19*, sin embargo, no todas presentan el fenotipo descrito en la tesis de maestría de Jarvio-Blanco 2006. Además, se cuentan con dos alelos mutantes por inserción de T-DNA.

Con la finalidad de esclarecer si existe una correlación entre la intensidad del fenotipo que presentan las plantas transgénicas y los niveles de sobreexpresión de *AGL19*, se analizó por medio de RT-PCR y *northern blot* la acumulación del mensajero de este gen en cinco líneas independientes homocigotas de *35S::AGL19* con diversos fenotipos que se muestran en la Figura 10. En términos generales los resultados indican que existe una correlación entre el nivel de sobreexpresión de *AGL19* con la intensidad del fenotipo que presentan; por ejemplo, las líneas 23.8.5 y 25.8.8 son las que tienen el fenotipo más evidente en la mayoría de las plantas y presentan los niveles más elevados de acumulación del mensajero, como se puede apreciar por el *northern blot* y en la RT-PCR (Figura 10 H-I), mientras que la línea 16.6.7 (Figura 10 D) y el alelo mutante *agl19-1* (no mostrado), que tienen los niveles más bajos de sobreexpresión del mensajero, su fenotipo es similar al silvestre (Figura 10 H-I).

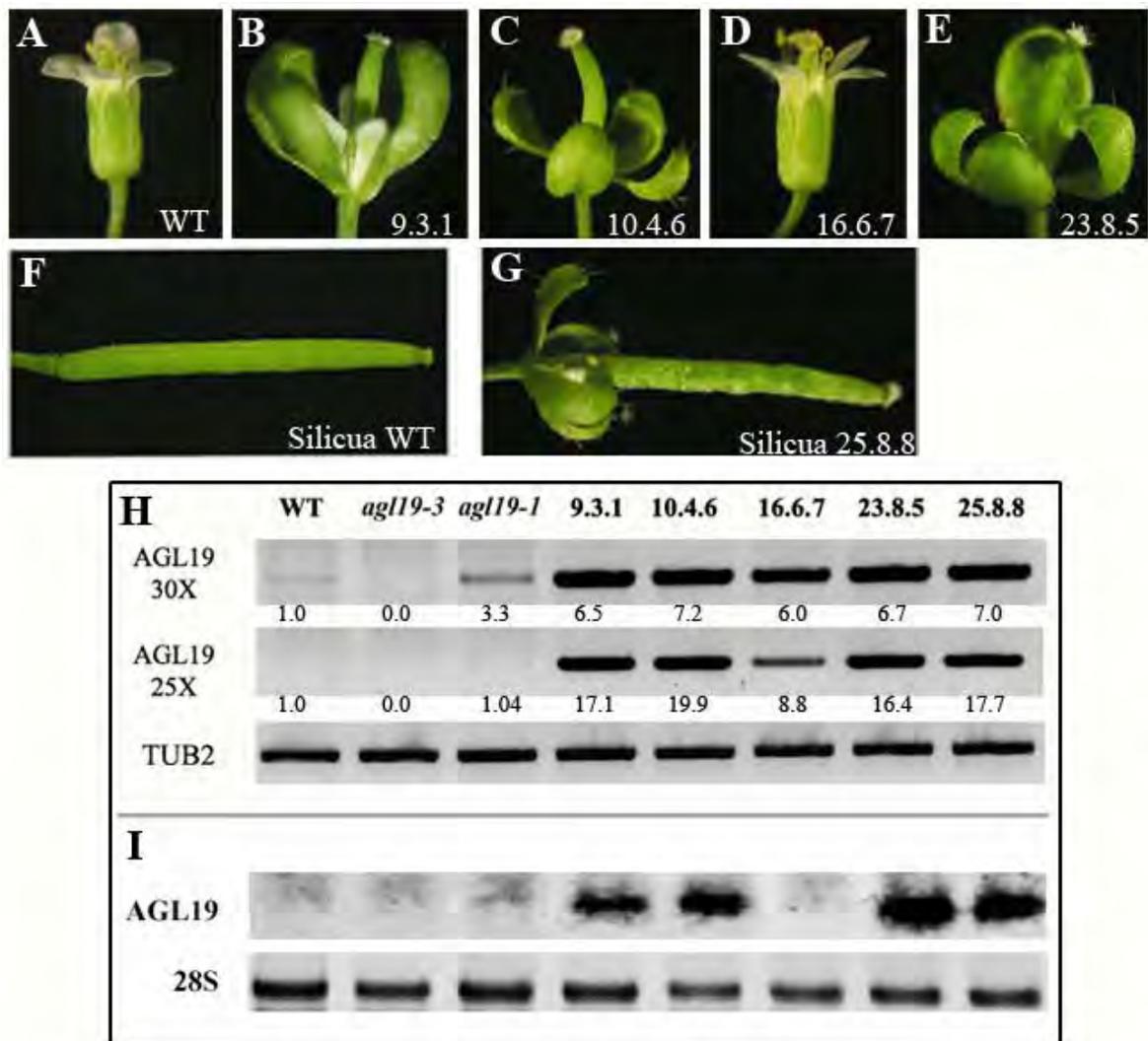


Figura 10. Correlación entre los niveles de expresión de *AGL19* y la penetrancia del fenotipo. **A)** Flor silvestre; **B)** Flor representativa de la línea 9.3.1 la cual presenta sépalos grandes en el 90 % de las plantas; **C)** La línea 10.4.6 muestra sépalos grandes en un 50% de las plantas; **D)** La línea 16.6.7 tiene un fenotipo similar al silvestre en 100 % de las plantas; **E)** La línea 23.8.5 y 25.8.8 presentan fenotipos de sépalos grandes en un 95 % de las plantas; **F)** Silicua silvestre; **G)** Los sépalos permanecen en la silicua de todas las líneas que muestran fenotipo, (ej. 25.8.8). **H)** Expresión de *AGL19* por RT-PCR en los dos alelos mutantes de *AGL19* y en las líneas de sobre expresión, a 30 y 25 ciclos (X), respectivamente. Los números indican la cuantificación relativa normalizada con respecto a los valores de la *TUB2*. **I)** Northern blot para *AGL19*, como control de carga se muestra el rRNA 28S. Tanto para el RT-PCR como el Northern blot se utilizó RNA total de la parte aérea de plantas de 14 DPS.

Con la finalidad de determinar el tiempo de floración se cuantificaron dos parámetros que nos indican que la fase vegetativa ha terminado e inicia la etapa reproductiva: Primero

el número de días a los cuales emerge el escapo y segundo el número de hojas de roseta que tiene la planta en ese momento.

Los resultados nos indican que también hay una correlación entre los niveles de sobreexpresión de *AGL19* y el tiempo en el que florecen las plantas. Las cuatro líneas (9.3.1, 10.4.6, 23.8.5 y 25.8.8) que florecen aprox. 10 días antes que el silvestre, son las mismas que sobreexpresan más al gen y la línea que sobreexpresa menos (16.6.7) florece prácticamente al mismo tiempo que el silvestre. No encontramos diferencias en el tiempo de floración en las dos líneas mutantes con respecto al silvestre (Figura 11 A). Sin embargo, la mutante nula *agl19-3* muestra un menor número de

hojas, sugiriendo que *AGL19* puede estar participando en el desarrollo de las hojas durante la etapa vegetativa en LD (Figura 11 B).

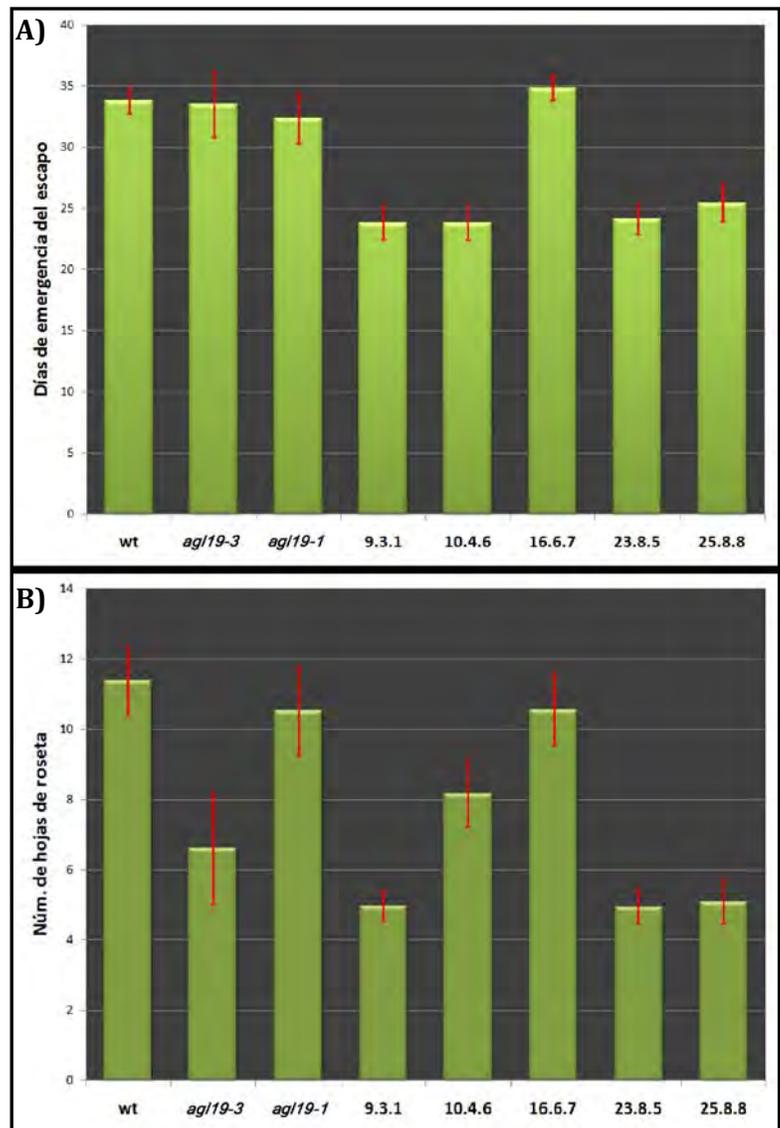


Figura 11. La aceleración del tiempo de floración debido a la sobreexpresión de *AGL19* es dosis dependiente. En la gráfica de arriba se muestran los días de emergencia del escapo y en la de abajo el número de hojas de roseta de las cinco líneas de 35S::*AGL19* y los dos alelos mutantes con respecto al silvestre (wt). Las líneas rojas representan la desviación estándar con una n = 32 plantas por línea.

6.2. La sobreexpresión de *AP1* complementa parcialmente el fenotipo floral que causa la sobreexpresión de *AGL19*

La mutante *ap1* presenta un fenotipo de reversión floral debido a que los genes de identidad del IM invaden el FM. Puesto que las plantas que más sobreexpresan *AGL19* también tienen cierto grado de reversión floral, existe la posibilidad de que la sobreexpresión de *AGL19* reprima a *LFY* y/o *AP1* como se planteó en la hipótesis. Por lo tanto, con anterioridad se realizó la cruce de la línea de *35S::AGL19* (23.8.5) con la de *35S::AP1* (Blanco-Jarvio 2006) y en el presente trabajo se analizó una línea homocigota para ambas construcciones.

El análisis muestra que hay una complementación parcial del fenotipo de sépalos grandes. En las plantas de la línea 23.8.5; 5 de 7 de las primeras flores del tallo principal presentan sépalos grandes, posteriormente 3 a 4 flores tienen sépalos medianos y las subsiguientes flores son parecidas a las flores silvestres. Las plantas que sobreexpresan *AP1*, presentan una transformación del meristemo de inflorescencia primario y secundario en meristemas florales, como ha sido reportado (Liljegren *et al.* 1999). En la cruce *35S::AGL19* x *35S::AP1* sólo tiene de 3 a 4 flores con sépalos medianos y el resto de las flores son parecidas a las silvestres. Además, la línea que sobreexpresa ambos genes complementa el fenotipo determinado de la línea *35S::AP1* recuperando su altura y ramificación como se muestra en la Figura 12 A.

Tanto la línea de 35S::*AGL19* como la de 35S::*AP1* son de floración temprana. Decidimos analizar el tiempo de floración entre las parentales y la cruce, y determinamos que esta última, florece al mismo tiempo que las dos parentales (Figura 12 B). Por lo tanto el tiempo de floración no se complementa al estado silvestre ni tampoco tiene un efecto sumatorio, lo que nos indica que ambos genes pueden estar involucrados directamente.

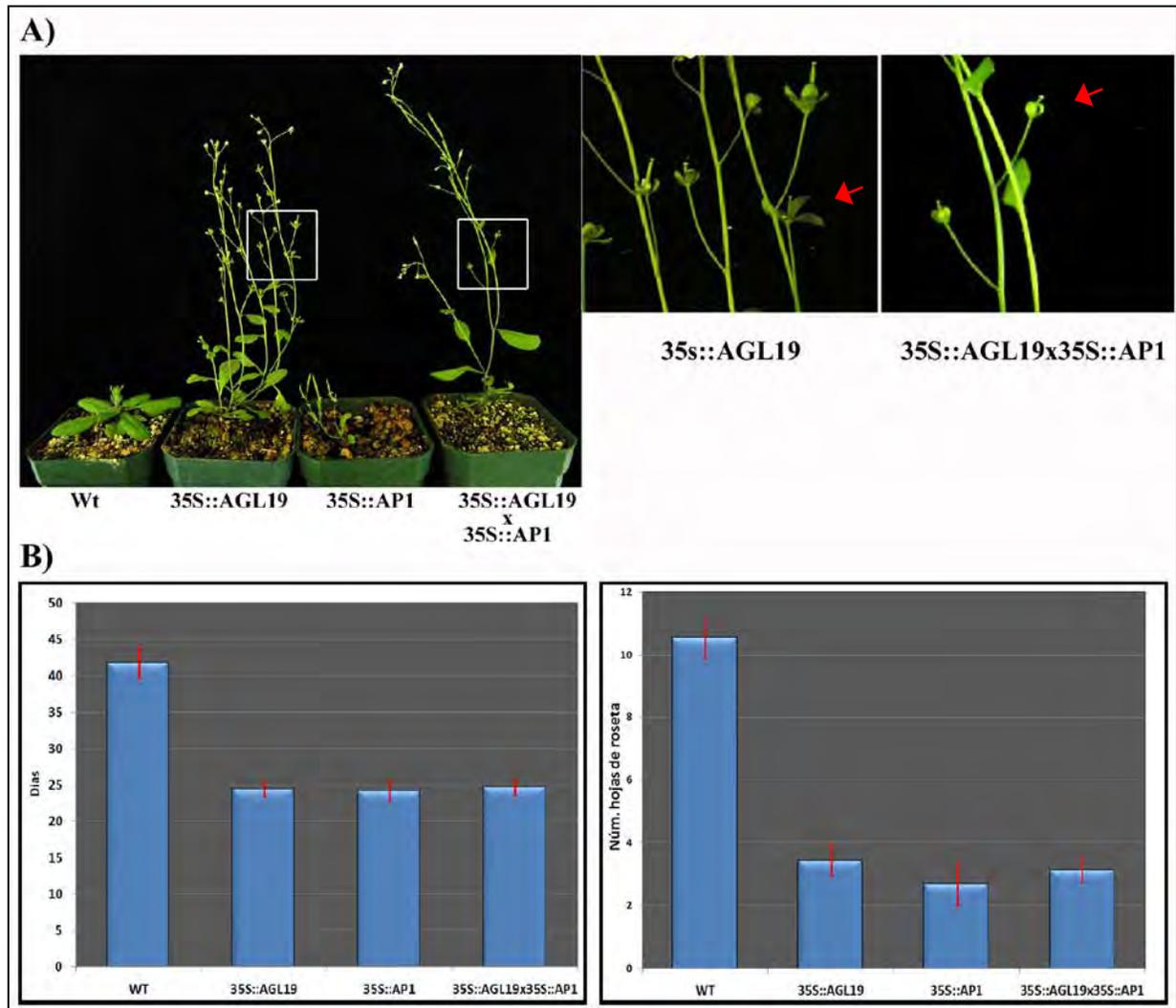


Figura 12. Complementación parcial del fenotipo observado en la línea 35S::*AGL19* (23.8.5) por la sobreexpresión de *AP1*. (A) Plantas de la misma edad en que se observa la complementación del fenotipo, a la derecha se muestran acercamientos de los recuadros blancos. (B) Análisis del tiempo de floración en LD, en donde se muestran los días de emergencia del escapo (gráfica de la izquierda) y el número de hojas de roseta (gráfica de la derecha) las barras rojas muestran la desviación estándar de una n= 32.

Estos datos nos sugieren que la sobreexpresión de *AGL19* podría estar reprimiendo a *LFY* y a *AP1* en cuanto al fenotipo de la reversión floral, pero no explica la floración temprana observada en esta línea, por lo que decidimos analizar la acumulación de estos y otros mensajeros relacionados.

6.3. *AGL19* y la regulación de la expresión de algunos genes que participan en el tiempo de floración e identidad del FM

Con la finalidad de analizar la acumulación de los mensajeros de *LFY* y *AP1* se realizaron RT-PCR semicuantitativas de estos genes utilizando RNA de la parte aérea de plantas de 14 DPS de las dos líneas mutantes y las cinco líneas de sobreexpresión de *AGL19*. Los resultados nos indican que *AGL19* regula positivamente a *LFY* y *AP1* y esta inducción puede ser dosis dependiente porque es más clara en las líneas fuertes de sobreexpresión de este gen (Figura 13). Esta regulación podría ser directa o indirecta, por lo que decidimos analizar la expresión de algunos genes importantes para la transición a la floración y que sabemos participan en la expresión de *LFY* y *AP1*.

Los resultados indican que *AGL19* no influye en la regulación transcripcional de *CO* ni de *FT*, dos genes importantes en la vía del fotoperiodo, ni tampoco a los inductores directos de *LFY*, es decir, *AGL24* y *SOC1*. También analizamos a dos represores importantes de la floración *SVP* y *FLC*, que esperábamos que estuvieran reprimidos en las líneas fuertes de sobreexpresión de *AGL19*. No encontramos variación en la acumulación del mensajero de *SVP* y los datos no fueron concluyentes para *FLC*, ya que no se observó una dosis dependencia como se había descrito con anterioridad.

De estos resultados concluimos que *AGL19* promueve la expresión de *LFY* y *AP1* y que esta regulación no es por la inducción de otros genes importantes para la transición floral,

apoyando el fenotipo de floración temprana observado en las líneas de sobreexpresión. Sin embargo, contradice nuestra hipótesis original (ver secciones posteriores).

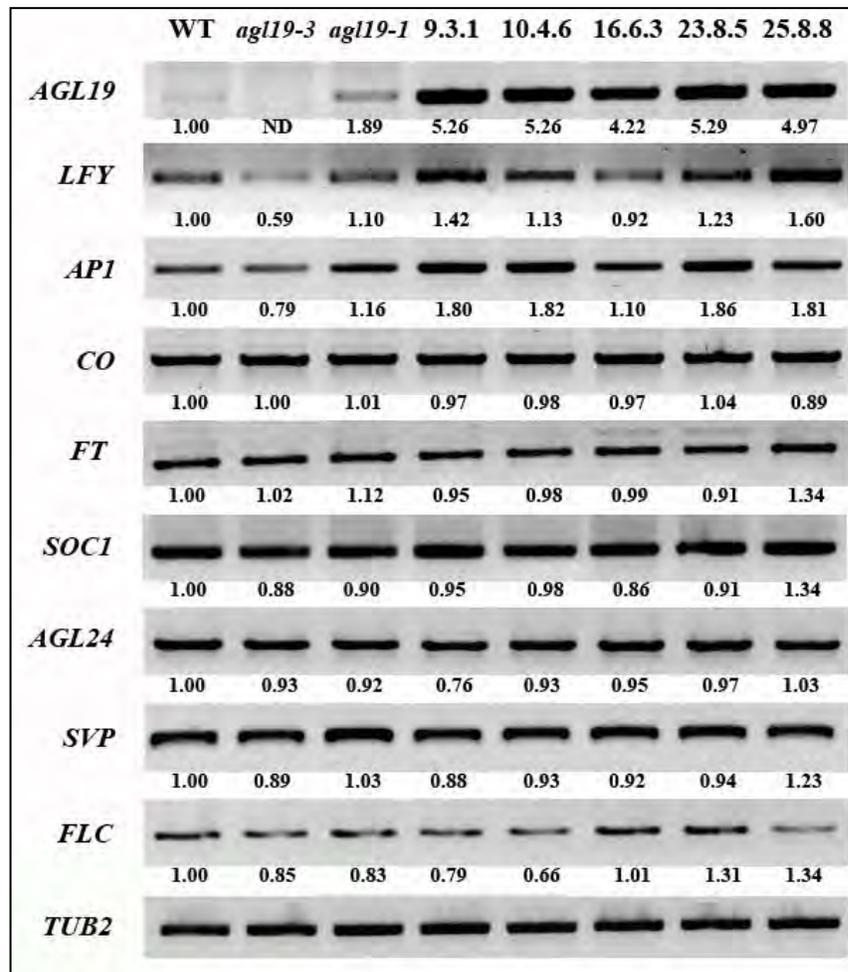


Figura 13. Efecto de la pérdida y ganancia de función de *AGL19* en la acumulación de los mensajeros de varios genes implicados en el tiempo de floración e identidad del FM. RT-PCR semicuantitativa para cada uno de los genes indicados en la columna de la izquierda, en diferentes líneas de plantas de 14 DPS indicadas en la parte superior. El RNA se extrajo sólo de la parte aérea y se utilizó a la *TUBULINA2* como control interno.

6.4. *AGL19* promueve la floración al inducir prematuramente a *LFY* y *AP1*

El resultado anterior no excluye la posibilidad de que la inducción de *LFY* y *AP1* fuera transitoria, es decir, que la sobreexpresión de *AGL19* promoviera prematuramente estos dos genes de FMI, lo que explicaría la floración temprana, pero, que en etapas más

avanzadas fueran reprimidos y de esta forma se mantuviera el fenotipo de reversión floral. Por lo que se colectaron plantas de tres edades diferentes considerando la etapa vegetativa (6 DPS), la transición a la floración (12 DPS) y hasta el tiempo en que las plantas desarrollan las inflorescencias (18 DPS) (Figura 14).

Los resultados indican que cuando se sobreexpresa a *AGL19* constitutivamente se promueve la expresión de *LFY* y *AP1* prematuramente y esta acumulación del mensajero permanece en el tiempo. Además en el fondo mutante *agl19-3* (nulo) disminuye la expresión de ambos genes (Figura 14), confirmando que *AGL19* participa en su inducción.

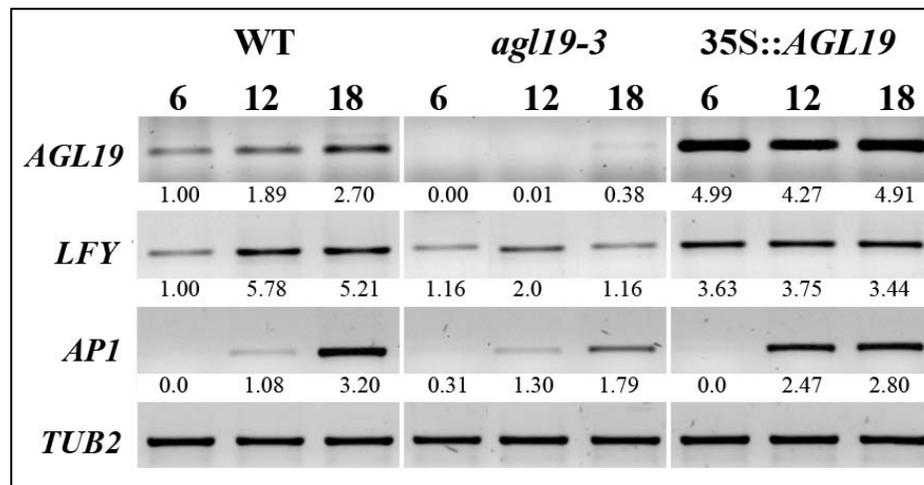


Figura 14. La sobreexpresión de *AGL19* promueve prematuramente la expresión de *LFY* y *AP1*. Análisis de expresión por RT-PCR de *AGL19*, *LFY* y *AP1* en plantas silvestres (wt) mutante nula *agl19-3* y de sobreexpresión de *AGL19* (23.8.5) en plantas de 6, 12 y 18 DPS.

6.5. Regulación de *AGL19* en relación con *AGL24*, *SOC1* y *AGL14*

Se ha descrito que *AGL19* y *AGL24* promueven la floración por la vía de vernalización independientemente de *FLC* (Yu *et al.* 2002; Schönrock *et al.* 2006). Sin embargo, no está claro si existe una interacción genética entre ellos. Además, resultados previos muestran que *AGL19* no regula a *SOC1*, pero no se sabe si *SOC1* regula a *AGL19*, así mismo, se desconoce si existe alguna regulación transcripcional entre *AGL19* y *AGL14*. Por lo tanto,

con el fin de contribuir en el esclarecimiento de estas interacciones, se analizaron los niveles de expresión por RT-PCR semicuantitativa, en plantas vernalizadas y sin vernalizar de 11 días en diferentes fondos mutantes. Los resultados muestran que efectivamente el mensajero de *AGL19* se acumula en mayor cantidad después de la vernalización incluso en mayor cantidad que *AGL24* y *SOC1*. Otro resultado importante es que *AGL14*, *AGL24* y *SOC1* regulan negativamente la transcripción de *AGL19* cuando las plantas no están vernalizadas, pero esta regulación negativa no afecta su expresión cuando las plantas se vernalizan (Figura 15). *AGL24* y *SOC1* son excluidos del meristemo de flor posterior a la inducción de la floración (ver introducción), por lo que hace posible suponer que la represión de *AGL19* por estos genes y posiblemente la de *AGL14* también, se lleve a cabo en el meristemo de inflorescencia.

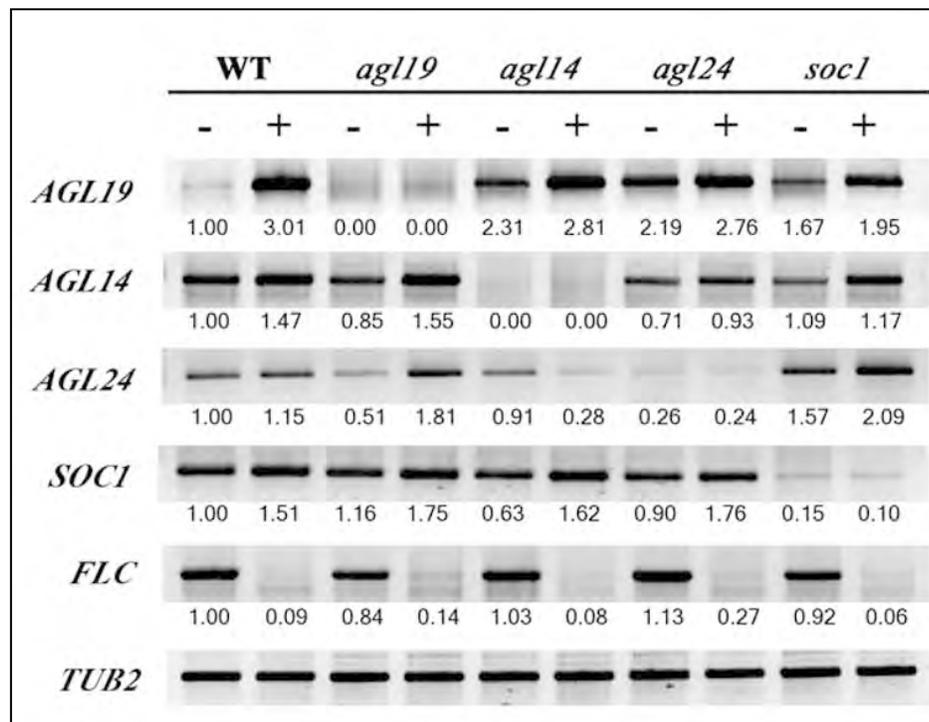


Figura 15. *AGL19* se acumula en respuesta a la vernalización y es inhibido por genes que se expresan en el IM. Por medio de RT-PCR semicuantitativa se muestran la expresión de *AGL19*, *AGL14*, *AGL24*, *SOC1* y *FLC* en plantas sin vernalizar(-) y en plantas vernalizadas (+) en los respectivos fondos mutantes mostrados en la parte superior. Los números indican la expresión relativa normalizada con respecto a la *TUB2*.

6.6 La reversión causada por la sobreexpresión de *AGL19* probablemente es por la inducción de *TFL1*

Si el fenotipo de reversión floral observado en las líneas de mayor sobreexpresión de *AGL19* no está dado por la represión de *LFY* y *AP1*, este podría deberse a la sobreexpresión de genes de identidad de inflorescencia. Con tal finalidad y con la premisa del experimento anterior (Figura 15) se volvió a analizar la expresión de *AGL19*, *AGL14*, *AGL24* y *SOC1* en plantas mutantes y también de sobreexpresión de estos genes, y además se vio la acumulación del mensajero de *TFL1*, un gen muy importante en el mantenimiento de las células indiferenciadas del IM.

Los resultados confirman que efectivamente *AGL14*, *AGL24* y *SOC1* regulan negativamente la acumulación del mensajero de *AGL19*, puesto que el mensajero de *AGL19*

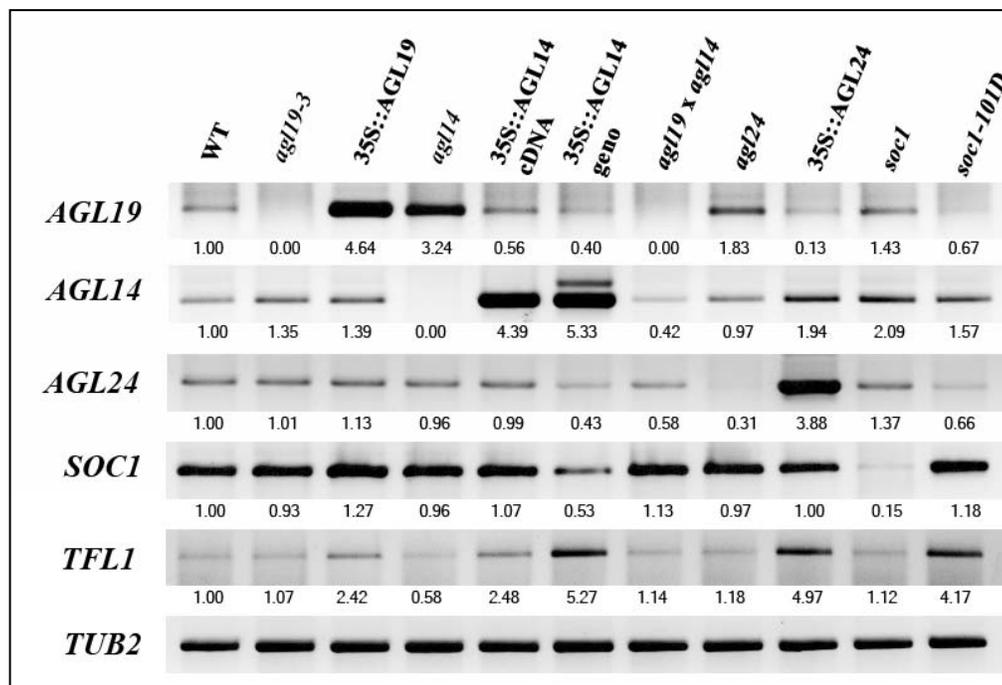


Figura 16. La reversión causada por la sobreexpresión de *AGL19* probablemente es por la inducción de *TFL1*. Análisis de expresión por RT-PCR en plantas de 14 DPS de los genes indicados en la columna izquierda, en las líneas de la parte superior. Los números indican la acumulación relativa normalizada con respecto a la *TUB2*

aumenta en las líneas mutantes de estos genes y disminuye considerablemente en las líneas de sobreexpresión respectivas (Figura 16).

Un resultado sumamente importante es que la sobreexpresión de *AGL14* genómico, *AGL24* y *SOC1* promueven la acumulación del mensajero de *TFL1*, así como la sobreexpresión de *AGL19* aunque en menor grado que los anteriores. Sin embargo, solamente en el mutante de *agl14* observamos que el transcrito de *TFL1* disminuye, por lo que posiblemente *AGL14* sea un regulador positivo de *TFL1* y que al sobreexpresarse los otros genes incluido *AGL19*, sean redundantes funcionales con éste.

7. Discusión

En la presente tesis nos enfocamos a responder la pregunta de ¿Por qué algunas líneas de sobreexpresión de *AGL19* son de floración temprana y además presentan reversión floral?

En el laboratorio inicialmente se contaban con cinco líneas de *35S::AGL19* de las cuales no todas presentaban fenotipo de floración temprana ni de reversión floral, mis resultados muestran claramente que los niveles de expresión de *AGL19* son importantes tanto en la aceleración del tiempo de floración como en el fenotipo de reversión floral. Las líneas fuertes de *35S::AGL19* que florecen antes, son aquellas que paralelamente también tienen los fenotipos más evidentes de reversión floral, mientras que las líneas débiles 16.6.7 y *agl19-1* no presenta ninguno de los dos fenotipos observados. Los resultados también muestran que la expresión de *LFY* y *AP1* se promueve prematuramente en el desarrollo debido a la sobreexpresión de *AGL19* y esta acumulación se mantiene en el tiempo favoreciendo la floración temprana. Además, los datos indican que hay una ligera disminución de la expresión de *LFY* y *AP1* en la mutante nula *agl19-3*, sugiriendo que este gene MADS-box es importante en la regulación de *LFY*, pero no indispensable, ya que esta

mutante no muestra retraso en el tiempo de floración, indicando que puede haber redundancia funcional con otros MADS-box, probablemente AGL14, SOC1 y/o AGL24 que también regulan a *LFY* (Liu *et al.* 2008).

Se ha reportado (Schönrock *et al.* 2006) y nuestros datos confirman que AGL19 promueve la floración independientemente de la activación de *SOC1* por vernalización. Por otra parte, experimentos de doble híbrido describen que AGL19 puede interactuar con *SOC1* (de Folter *et al.* 2005) sugiriendo que *in vivo* existe un complejo multimérico en el que podrían participar *SOC1*, AGL24, AGL19 y/o AGL14 ya que este último interactúa con los otros dos. Este complejo podría ser el responsable de la inducción directa de *LFY*. Datos genéticos sustentan esta hipótesis puesto que la doble mutante *agl19 soc1* presenta un ligero retraso en el tiempo de floración en comparación con la mutante sencilla *soc1* (Schönrock *et al.* 2006). No obstante, estos datos genéticos resultan algo controvertidos, puesto que el alelo que utilizaron en ese estudio es *agl19-1*, es decir, el mismo que en nuestro laboratorio (Villajuana-Bonequi 2006), y en esta tesis (Figura 10), reportamos como de sobreexpresión y no como una mutante nula. Por lo que sería importante realizar un ensayo de floración utilizando el doble mutante *agl19-3 soc1-3*, esperando obtener un retraso mayor en el tiempo de floración en comparación con la mutante sencilla de *soc1-3* y además una disminución en la expresión de *LFY*.

Tanto *AGL24* como *AGL19* son inducidos por vernalización (Michaels *et al.* 2003; Schönrock *et al.* 2006) y ambos actúan independientemente de *FLC* (Schönrock *et al.* 2006; Alexandre y Hennig 2008). Sin embargo en este trabajo encontramos que la inducción de *AGL19* es más fuerte que para *AGL24* (Figura 15) y además, que la represión de *AGL24* sobre *AGL19* en condiciones de LD, se elimina por la vernalización (Figura 15). Estos datos sugieren que ambas proteínas tienen redundancia funcional en la vía de la vernalización y

por lo tanto, la generación de una doble mutante *agl19 agl24* nos proporcionaría datos relevantes para la comprobación de esta hipótesis, esperando que la doble mutante se comporte como de floración tardía en condiciones de vernalización en comparación con las mutantes sencillas de cada uno de estos MADS-box, además de obtener una disminución importante en la expresión de *LFY*.

La hipótesis inicial de este trabajo era que *AGL19* participa en el establecimiento del meristemo de inflorescencia al regular negativamente a *LFY* y *AP1* y el fenotipo de reversión de meristemo floral a meristemo de inflorescencia sería resultado de la ganancia de función de *AGL19*. Sin embargo, es claro que *AGL19* no inhibe la expresión de *LFY* ni de *AP1*. Diversas evidencias nos indican que *AGL19* no se comporta como los otros genes de mantenimiento del IM (*AGL24*, *SOC1*, *FUL* y posiblemente *AGL14*), aunque sí podría interactuar con algunas de estas proteínas en la regulación del tiempo de floración especialmente después de la vernalización. La primera evidencia que tenemos es que los mutantes *agl24*, *soc1* y *agl14* son de floración tardía (Lee *et al.* 2000; Yu *et al.* 2002; Michaels *et al.* 2003; Yu *et al.* 2004; Villajuana-Bonequi 2006) y la mutante *agl19* no lo es (Blanco-Jarvio 2006; Schönrock *et al.* 2006). La segunda es que a diferencia de los genes del IM, datos preliminares de nuestro laboratorio, por hibridación *in situ*, muestran que *AGL19* se expresa principalmente en el FM (Perez-Ruiz en proceso). Por último *AGL24*, *SOC1* y *AGL14* reprimen a *AGL19* y probablemente lo excluyen del IM, aunque esto último habrá que corroborarlo con un mayor número de ensayos de hibridación *in situ*.

Las evidencias sugieren que el papel de *AGL19* está más asociado con la determinación y/o mantenimiento del FM, entonces ¿por qué se observa la reversión floral?. *AGL19* y *AGL14* pertenecen al mismo clado dentro de la familia de los MADS-box y comparten aproximadamente un 70 % de similitud (Alvarez-Buylla *et al.* 2000; Martinez-Castilla y

Alvarez-Buylla 2003). Cuando se sobreexpresa constitutivamente a *AGL14* presenta reversiones florales muy parecidas a las observadas en las líneas de *35S::AGL19*. En este trabajo demostramos que *AGL14* regula positivamente la acumulación de *TFL1* ya que en la mutante de *AGL14*, *TFL1* disminuye considerablemente (Figura 16) aunque no al grado de desaparecer, por lo que no vemos determinación del meristemo como ocurre en la mutante *tfl1*. Los datos sugieren que al sobreexpresarse constitutivamente a *AGL19*, este puede realizar las funciones que normalmente realiza *AGL14*, por ejemplo, inducir la expresión de *TFL1* (Figura 16), de tal forma que el IM se esté expandiendo provocando la reversión floral. Esta nueva hipótesis concuerda con que al sobreexpresar a un represor natural de *TFL1* como lo es *AP1* en la cruce *35S:AGL19 x 35S:AP1*, complementamos parcialmente este fenotipo (Figura 12).

Como se describió en la sección 1.5, la especificación de la identidad del meristemo de inflorescencia, el de flor, así como la de los órganos florales depende en gran medida del antagonismo que hay entre cada una de las señales pertenecientes a cada meristemo, y cuando se rompe este balance ocurren cambios morfogénéticos que alteran a estos, explicando de esta forma el fenotipo de reversión floral que encontramos. Hasta ahora se desconocen genes inductores de *TFL1* por lo que resultados presentados abren una pauta muy importante en el entendimiento del desarrollo del IM y nuevas líneas de investigación sobre este tema.

Aun queda por esclarecer el papel de *AGL19*. Nuestros resultados sugieren que *AGL19* regula a *LFY* (Figura 17) aunque no sabemos si lo hace directamente, para lo cual se podrían hacer experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), si esto se comprueba entonces el papel de este MADS-box podría estar más asociado al mantenimiento de *LFY* en el MF, lo cual es necesario para la inducción de los genes ABC. En la mutante *agl19-3* no se observan fenotipos asociados al desarrollo de los órganos florales, por lo que puede existir redundancia funcional con otros genes MADS-box, por ejemplo, la proteína de *AGL21* puede interactuar con la proteína de *AGL19* (de Folter *et al.* 2005), o también puede haber redundancia con *AP1* o *CAL* los cuales mantienen la expresión de *LFY* en el FM (Benlloch *et al.* 2007). Con la finalidad de comprobar estas hipótesis se realizarán dobles mutantes *agl19* x *agl21*, *agl19* x *ap1* y *agl19* x *cal* en trabajo futuro.

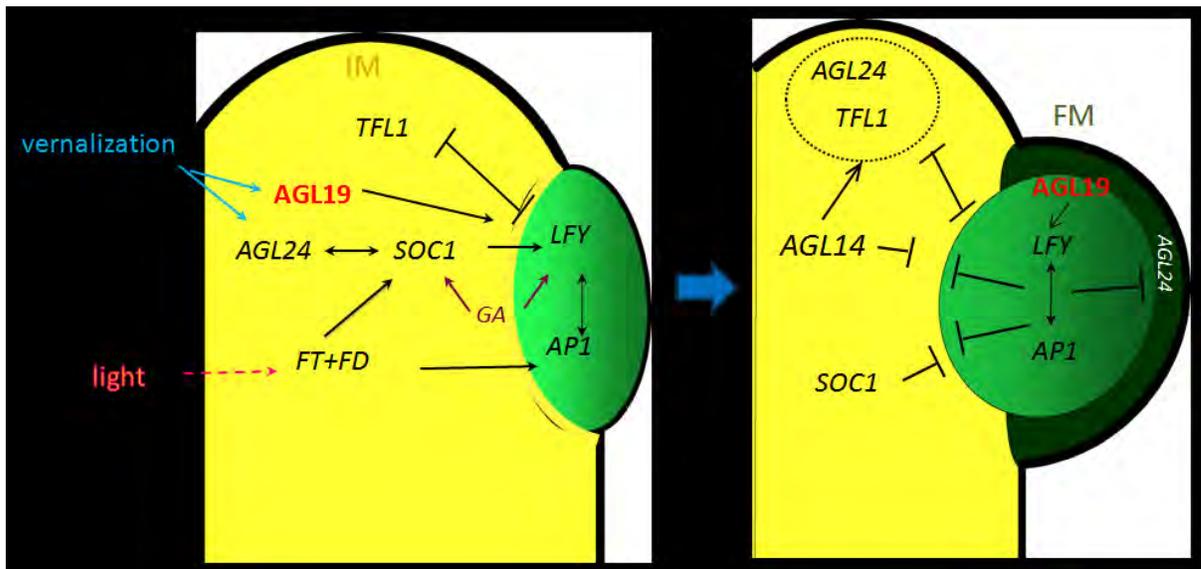


Figura 17. Modelo de espacio temporal de inducción y mantenimiento del FM. Genes promotores de la floración como *FT*, *AGL24* y *SOC1* responden a señales ambientales e internas como la luz, la vernalización y de giberelinas (GA) respectivamente. Estos genes inducen la expresión de genes de identidad del meristemo floral como *LFY* y *AP1*. Sin embargo, más tarde en el desarrollo, *LFY* y *AP1* excluyen del FM a *TFL1*, *AGL24*, *SOC1* y probablemente a *AGL14*. Por otra parte, *AGL19* responde a la vernalización y promueve la floración al inducir a *LFY* pero durante el establecimiento del FM, a diferencia de los otros promotores de la floración, es excluido del IM por *AGL14*, *SOC1* y *AGL24* al FM donde podría estar manteniendo la expresión de *LFY*. (Modificado de Alvarez-Buylla *et al.* 2010)

8. Conclusiones

- Los fenotipos de reversión floral y de floración temprana causados por la sobreexpresión de *AGL19* son dosis dependientes.
- *AGL19* promueve la floración al inducir prematuramente a *LFY* y *AP1* y no al inducir a otros genes del tiempo de floración como *CO*, *FT*, *SOC1* ó *AGL24*.
- La reversión floral causada por la sobreexpresión de *AGL19* probablemente es por la inducción transcripcional de *TFL1* y esta inducción es complementada por la sobreexpresión de *AP1*.
- El probable inductor endógeno de *TFL1* es *AGL14* y no *AGL19*.
- *AGL19* se expresa en el meristemo de flor y es regulado negativamente por genes que se expresan en el meristemo de inflorescencia como *SOC1*, *AGL24* y *AGL14*.

9. Referencias

- Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Notaguchi M., Goto K. and Araki T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**: 1052-6
- Aida M., Ishida T. and Tasaka M. 1999. Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**: 1563-70
- Alexandre C. M. and Hennig L. 2008. FLC or not FLC: the other side of vernalization. *J Exp Bot* **59**: 1127-35
- Alvarez-Buylla E. R., Pelaz S., Liljegren S. J., Gold S. E., Burgeff C., Ditta G. S., Ribas de Pouplana L., Martinez-Castilla L. and Yanofsky M. F. 2000. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5328-33
- Alvarez-Buylla E. R., Garcia-Ponce B. and Garay-Arroyo A. 2006. Unique and redundant functional domains of APETALA1 and CAULIFLOWER, two recently duplicated Arabidopsis thaliana floral MADS-box genes. *J Exp Bot* **57**: 3099-107
- Alvarez-Buylla E. R., Benítez M., Corvera-Poiré A., Cador Á. C., Folter S. d., Buen A. G. d., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes-Miranda F., Pérez-Ruiz R. V., Piñeyro-Nelson A. and Sánchez-Corrales Y. E. 2010. Flower Development. *The Arabidopsis Book*.
- Alvarez J., Guli C. L., Yu X. and Smyth D. R. 1992. Terminal flower: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **2**: 103-116
- Ausin I., Alonso-Blanco C., Jarillo J. A., Ruiz-Garcia L. and Martinez-Zapater J. M. 2004. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet* **36**: 162-6
- Barton M. K. and Poethig R. S. 1993. Formation of the shoot apical meristem in Arabidopsis thaliana: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* **119**: 823-831
- Bastow R., Mylne J. S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R. A. and Dean C. 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* **427**: 164-7
- Baurle I. and Dean C. 2006. The timing of developmental transitions in plants. *Cell* **125**: 655-64
- Benlloch R., Berbel A., Serrano-Mislata A. and Madueno F. 2007. Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Ann Bot (Lond)* **100**: 659-76
- Blanco-Jarvio A. 2006. *Función del gen MADS-box AGL19 durante el desarrollo floral de Arabidopsis thaliana*. UNAM. Ciudad de México. Tesis de Maestría. pp: 51
- Blazquez M. A., Soowal L. N., Lee I. and Weigel D. 1997. LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* **124**: 3835-44
- Blazquez M. A., Green R., Nilsson O., Sussman M. R. and Weigel D. 1998. Gibberellins promote flowering of arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* **10**: 791-800
- Blazquez M. A., Koornneef M. and Putterill J. 2001. Flowering on time: genes that regulate the floral transition. Workshop on the molecular basis of flowering time control. *EMBO Rep* **2**: 1078-82
- Blazquez M. A., Ferrandiz C., Madueno F. and Parcy F. 2006. How floral meristems are built. *Plant Mol Biol* **60**: 855-70

- Borner R., Kampmann G., Chandler J., Gleissner R., Wisman E., Apel K. and Melzer S. 2000. A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. *Plant J* **24**: 591-9
- Bowman J. L., Alvarez J., Weigel D., Meyerowitz E. M. and Smyth D. R. 1993. Control of flower development in Arabidopsis thaliana by APETALA1 and interacting genes. *Development* **119**: 721-743
- Bowman J. L. 1994. *Arabidopsis : an atlas of morphology and development*. Springer-Verlag, New York. pp: 450
- Bowman J. L. and Eshed Y. 2000. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci* **5**: 110-5
- Bradley D., Ratcliffe O., Vincent C., Carpenter R. and Coen E. 1997. Inflorescence commitment and architecture in Arabidopsis. *Science* **275**: 80-3
- Brand U., Fletcher J. C., Hobe M., Meyerowitz E. M. and Simon R. 2000. Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**: 617-9
- Carles C. C. and Fletcher J. C. 2003. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci* **8**: 394-401
- Clark S. E., Running M. P. and Meyerowitz E. M. 1995. CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. *Development* **121**: 2057-2067
- Clark S. E., Jacobsen S. E., Levin J. Z. and Meyerowitz E. M. 1996. The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in Arabidopsis. *Development* **122**: 1567-75
- Clark S. E., Williams R. W. and Meyerowitz E. M. 1997. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**: 575-85
- Coen E. S. and Meyerowitz E. M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* **353**: 31-7
- Cole M., Nolte C. and Werr W. 2006. Nuclear import of the transcription factor SHOOT MERISTEMLESS depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete sub-domains of the shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res* **34**: 1281-92
- Conti L. and Bradley D. 2007. TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling Arabidopsis architecture. *Plant Cell* **19**: 767-78
- de Folter S., Immink R. G., Kieffer M., Parenicova L., Henz S. R., Weigel D., Busscher M., Kooiker M., Colombo L., Kater M. M., Davies B. and Angenent G. C. 2005. Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**: 1424-33
- Endrizzi K., Moussian B., Haecker A., Levin J. Z. and Laux T. 1996. The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J* **10**: 967-79
- Eriksson S., Bohlenius H., Moritz T. and Nilsson O. 2006. GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *Plant Cell* **18**: 2172-81
- Ferrandiz C., Gu Q., Martienssen R. and Yanofsky M. F. 2000. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**: 725-34

- Fletcher J. C., Brand U., Running M. P., Simon R. and Meyerowitz E. M. 1999. Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**: 1911-4
- Gallois J. L., Woodward C., Reddy G. V. and Sablowski R. 2002. Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. *Development* **129**: 3207-17
- Gallois J. L., Nora F. R., Mizukami Y. and Sablowski R. 2004. WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev* **18**: 375-80
- Gilbert S. F. 2003. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, New York. pp: 838
- Gu Q., Ferrandiz C., Yanofsky M. F. and Martienssen R. 1998. The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development* **125**: 1509-17
- Hall R. D. 2000. Plant cell culture initiation. Practical tips. *Mol Biotechnol* **16**: 161-73
- Hartmann U., Hohmann S., Nettesheim K., Wisman E., Saedler H. and Huijser P. 2000. Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J* **21**: 351-60
- He Y., Michaels S. D. and Amasino R. M. 2003. Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. *Science* **302**: 1751-4
- Helliwell C. A., Wood C. C., Robertson M., James Peacock W. and 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. *Plant J* **46**: 183-92
- Hempel F. D., Weigel D., Mandel M. A., Ditta G., Zambryski P. C., Feldman L. J. and Yanofsky M. F. 1997. Floral determination and expression of floral regulatory genes in Arabidopsis. *Development* **124**: 3845-53
- Hepworth S. R., Valverde F., Ravenscroft D., Mouradov A. and Coupland G. 2002. Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J* **21**: 4327-37
- Huala E. and Sussex I. M. 1992. LEAFY Interacts with Floral Homeotic Genes to Regulate Arabidopsis Floral Development. *Plant Cell* **4**: 901-913
- Jeong S., Trotochaud A. E. and Clark S. E. 1999. The Arabidopsis CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**: 1925-34
- Jonsson H., Heisler M., Reddy G. V., Agrawal V., Gor V., Shapiro B. E., Mjolsness E. and Meyerowitz E. M. 2005. Modeling the organization of the WUSCHEL expression domain in the shoot apical meristem. *Bioinformatics* **21 Suppl 1**: i232-40
- Kempin S. A., Savidge B. and Yanofsky M. F. 1995. Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. *Science* **267**: 522-5
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters A. J. and Soppe W. 1998. Genetic Control of Flowering Time in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 345-370
- Lee H., Suh S. S., Park E., Cho E., Ahn J. H., Kim S. G., Lee J. S., Kwon Y. M. and Lee I. 2000. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes Dev* **14**: 2366-76
- Lee I., Aukerman M. J., Gore S. L., Lohman K. N., Michaels S. D., Weaver L. M., John M. C., Feldmann K. A. and Amasino R. M. 1994. Isolation of LUMINIDEPENDENS: a gene involved in the control of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell* **6**: 75-83
- Lee J. H., Yoo S. J., Park S. H., Hwang I., Lee J. S. and Ahn J. H. 2007. Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes Dev* **21**: 397-402

- Lenhard M., Bohnert A., Jurgens G. and Laux T. 2001. Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**: 805-814
- Levy Y. Y., Mesnage S., Mylne J. S., Gendall A. R. and Dean C. 2002. Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* **297**: 243-6
- Li D., Liu C., Shen L., Wu Y., Chen H., Robertson M., Helliwell C. A., Ito T., Meyerowitz E. and Yu H. 2008. A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev Cell* **15**: 110-20
- Liljegren S. J. and Yanofsky M. F. 1996. Genetic control of shoot and flower meristem behavior. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 865-9
- Liljegren S. J., Gustafson-Brown C., Pinyopich A., Ditta G. S. and Yanofsky M. F. 1999. Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell* **11**: 1007-18
- Liu C., Zhou J., Bracha-Drori K., Yalovsky S., Ito T. and Yu H. 2007. Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development* **134**: 1901-10
- Liu C., Chen H., Er H. L., Soo H. M., Kumar P. P., Han J. H., Liou Y. C. and Yu H. 2008. Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development* **135**: 1481-91
- Lohmann J. U., Hong R. L., Hobe M., Busch M. A., Parcy F., Simon R. and Weigel D. 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* **105**: 793-803
- Long J. and Barton M. K. 2000. Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. *Dev Biol* **218**: 341-53
- Long J. A. and Barton M. K. 1998. The development of apical embryonic pattern in Arabidopsis. *Development* **125**: 3027-35
- Maizel A., Busch M. A., Tanahashi T., Perkovic J., Kato M., Hasebe M. and Weigel D. 2005. The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science* **308**: 260-3
- Mandel M. A. and Yanofsky M. F. 1995a. A gene triggering flower formation in Arabidopsis. *Nature* **377**: 522-4
- Mandel M. A. and Yanofsky M. F. 1995b. The Arabidopsis AGL8 MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by APETALA1. *Plant Cell* **7**: 1763-71
- Marquardt S., Boss P. K., Hadfield J. and Dean C. 2006. Additional targets of the Arabidopsis autonomous pathway members, FCA and FY. *J Exp Bot* **57**: 3379-86
- Martinez-Castilla L. P. and Alvarez-Buylla E. R. 2003. Adaptive evolution in the Arabidopsis MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 13407-12
- Mayer K. F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jurgens G. and Laux T. 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell* **95**: 805-15
- Melzer R., Verelst W. and Theissen G. 2009. The class E floral homeotic protein SEPALLATA3 is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes in vitro. *Nucleic Acids Res* **37**: 144-57
- Messenguy F. and Dubois E. 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* **316**: 1-21
- Meyerowitz E. M. and Chang C. 1988. Molecular biology of plant growth and development. Arabidopsis thaliana as an experimental system. *Dev Biol (N Y 1985)* **5**: 353-66

- Meyerowitz E. M. 1994a. Plant developmental biology: green genes for the 21st century. *Bioessays* **16**: 621-5
- Meyerowitz E. M. 1994b. Pattern formation in plant development: four vignettes. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 602-8
- Meyerowitz E. M. 1999. Plants, animals and the logic of development. *Trends Cell Biol* **9**: M65-8
- Meyerowitz E. M. 2001. Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiol* **125**: 15-9
- Meyerowitz E. M. 2002. Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**: 1482-5
- Micol J. L. and Hake S. 2003. The development of plant leaves. *Plant Physiol* **131**: 389-94
- Michaels S. D., Ditta G., Gustafson-Brown C., Pelaz S., Yanofsky M. and Amasino R. M. 2003. AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *Plant J* **33**: 867-74
- Michaels S. D. 2009. Flowering time regulation produces much fruit. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 75-80
- Mizoguchi T., Wright L., Fujiwara S., Cremer F., Lee K., Onouchi H., Mouradov A., Fowler S., Kamada H., Putterill J. and Coupland G. 2005. Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 2255-70
- Moon J., Suh S. S., Lee H., Choi K. R., Hong C. B., Paek N. C., Kim S. G. and Lee I. 2003. The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J* **35**: 613-23
- Mylne J. S., Barrett L., Tessadori F., Mesnage S., Johnson L., Bernatavichute Y. V., Jacobsen S. E., Fransz P. and Dean C. 2006. LHP1, the Arabidopsis homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5012-7
- Ng M. and Yanofsky M. F. 2001. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Genet* **2**: 186-95
- Onouchi H., Igeno M. I., Perilleux C., Graves K. and Coupland G. 2000. Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell* **12**: 885-900
- Ortiz-Moreno E. 2002. *Análisis funcional preliminar de un gen Mads-box en el desarrollo de la raíz de Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.* UNAM. Ciudad de México. Licenciatura (Biologo). pp: 86
- Parcy F. 2005. Flowering: a time for integration. *Int J Dev Biol* **49**: 585-93
- Parenicova L., de Folter S., Kieffer M., Horner D. S., Favalli C., Busscher J., Cook H. E., Ingram R. M., Kater M. M., Davies B., Angenent G. C. and Colombo L. 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**: 1538-51
- Pelaz S., Ditta G. S., Baumann E., Wisman E. and Yanofsky M. F. 2000. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* **405**: 200-3
- Pelaz S., Gustafson-Brown C., Kohalmi S. E., Crosby W. L. and Yanofsky M. F. 2001. APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. *Plant J* **26**: 385-94
- Perez-Ruiz R. V. en proceso. *Participación funcional del gen MADS-box AGL14 en redes transcripcionales que regulan el comportamiento del meristemo aéreo* UNAM. Ciudad de México. Tesis de Doctorado. pp:

- Poethig R. S. 1987. Clonal Analysis of Cell Lineage Patterns in Plant Development. *Am. J. Bot.* **74**: 581-594
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R. and Coupland G. 1995. The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847-57
- Putterill J., Laurie R. and Macknight R. 2004. It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* **26**: 363-73
- Ratcliffe O. J., Amaya I., Vincent C. A., Rothstein S., Carpenter R., Coen E. S. and Bradley D. J. 1998. A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* **125**: 1609-15
- Ratcliffe O. J., Kumimoto R. W., Wong B. J. and Riechmann J. L. 2003. Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell* **15**: 1159-69
- Redei G. P. 1975. Arabidopsis as a genetic tool. *Annu Rev Genet* **9**: 111-27
- Reinhardt D., Mandel T. and Kuhlemeier C. 2000. Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* **12**: 507-18
- Riechmann J. L., Krizek B. A. and Meyerowitz E. M. 1996a. Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4793-8
- Riechmann J. L., Wang M. and Meyerowitz E. M. 1996b. DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Res* **24**: 3134-41
- Riechmann J. L. and Meyerowitz E. M. 1997. Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. *Mol Biol Cell* **8**: 1243-59
- Roux F., Touzet P., Cuguen J. and Le Corre V. 2006. How to be early flowering: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci* **11**: 375-81
- Ruiz-Garcia L., Madueno F., Wilkinson M., Haughn G., Salinas J. and Martinez-Zapater J. M. 1997. Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **9**: 1921-34
- Running M. P., Clark S. E. and Meyerowitz E. M. 1995. Confocal microscopy of the shoot apex. *Methods Cell Biol* **49**: 217-29
- Saddic L. A., Huvermann B., Bezhani S., Su Y., Winter C. M., Kwon C. S., Collum R. P. and Wagner D. 2006. The LEAFY target LMI1 is a meristem identity regulator and acts together with LEAFY to regulate expression of CAULIFLOWER. *Development* **133**: 1673-82
- Samach A., Onouchi H., Gold S. E., Ditta G. S., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky M. F. and Coupland G. 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* **288**: 1613-6
- Scofield S., Dewitte W. and Murray J. A. 2007. The KNOX gene SHOOT MERISTEMLESS is required for the development of reproductive meristematic tissues in Arabidopsis. *Plant J* **50**: 767-81
- Schiefelbein J. W., Masucci J. D. and Wang H. 1997. Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* **9**: 1089-98
- Schönrock N., Bouveret R., Leroy O., Borghi L., Kohler C., Grissem W. and Hennig L. 2006. Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev* **20**: 1667-78

- Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K. F., Jurgens G. and Laux T. 2000. The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**: 635-44
- Schultz E. A. and Haughn G. W. 1991. LEAFY, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**: 771-781
- Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H. and Sommer H. 1990. Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. *Science* **250**: 931-936
- Shannon S. and Meeks-Wagner D. R. 1991. A Mutation in the Arabidopsis TFL1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development. *Plant Cell* **3**: 877-892
- Shannon S. and Meeks-Wagner D. R. 1993. Genetic Interactions That Regulate Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **5**: 639-655
- Sharma V. K. and Fletcher J. C. 2002. Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate. *Plant Physiol* **129**: 31-9
- Shore P. and Sharrocks A. D. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* **229**: 1-13
- Simpson G. G., Gendall A. R. and Dean C. 1999. When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 519-50
- Simpson G. G., Dijkwel P. P., Quesada V., Henderson I. and Dean C. 2003. FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the Arabidopsis floral transition. *Cell* **113**: 777-87
- Sung S. and Amasino R. M. 2004. Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159-64
- Sung S., He Y., Eshoo T. W., Tamada Y., Johnson L., Nakahigashi K., Goto K., Jacobsen S. E. and Amasino R. M. 2006. Epigenetic maintenance of the vernalized state in Arabidopsis thaliana requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat Genet* **38**: 706-10
- Taiz L. and Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts, USA. pp: 764
- Taylor C. B. 1997. Plant Vegetative Development: From Seed and Embryo to Shoot and Root. *Plant Cell* **9**: 981-988
- Trotochaud A. E., Jeong S. and Clark S. E. 2000. CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* **289**: 613-7
- Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A. and Coupland G. 2004. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003-6
- Villajuana-Bonequi M. 2006. *Papel funcional de dos genes MADS-box tipo SOC1 (AGL19 y AGL14) en las vías de regulación de la transición a la floración*. UNAM. Ciudad de México. Tesis de Maestría. pp: 50
- Weigel D., Alvarez J., Smyth D. R., Yanofsky M. F. and Meyerowitz E. M. 1992. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* **69**: 843-59
- Weigel D. and Nilsson O. 1995. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**: 495-500
- Wilson R. N., Heckman J. W. and Somerville C. R. 1992. Gibberellin Is Required for Flowering in Arabidopsis thaliana under Short Days. *Plant Physiol* **100**: 403-408
- William D. A., Su Y., Smith M. R., Lu M., Baldwin D. A. and Wagner D. 2004. Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1775-80
- Wolpert L., Beddington R., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E. and Smith J. 2002. *Principles of Development*. Oxford University Press, New York, USA. pp: 542

- Wood C. C., Robertson M., Tanner G., Peacock W. J., Dennis E. S. and Helliwell C. A. 2006. The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14631-6
- Yoo S. K., Chung K. S., Kim J., Lee J. H., Hong S. M., Yoo S. J., Yoo S. Y., Lee J. S. and Ahn J. H. 2005. CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 770-8
- Yu H., Xu Y., Tan E. L. and Kumar P. P. 2002. AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16336-41
- Yu H., Ito T., Wellmer F. and Meyerowitz E. M. 2004. Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development. *Nat Genet* **36**: 157-61

10. Abreviaturas

AGL14: AGAMOUS LIKE 14

AGL19: AGAMOUS LIKE 19

AGL24: AGAMOUS LIKE 24

AP1: APETALA1

CAL: CAULIFLOWER

CLV1, 2 y 3: CLAVATA1, 2, y 3

CO: CONSTANS

COL1: CONSTANS LIKE 1

CZ: Zona Central

DPS: Días postsiembra

FLC: FLOWERIN LOCUS C

FLD: FLOWERING LOCUS D

FM: Meristemo de Flor

FMI: Identidad del Meristemo de flor

FT: FLOWERIN LOCUS T

FUL: FRUITFUL

GA: Ácido Giberelico

IM: Meristemo de Inflorescencia

LD: Día Largo

LD: LUMINIDEPENDENS

LFY: LEAFY

LMI1: LATE MERISTEM IDENTITY1

MS: Murashige y Skoog

PcG: Grupo de los Polycomb

PZ: Zona Periférica

RAM: Meristemo Apical de la Raíz

RZ: Zona Medular

SAM: Meristemo Apical Aéreo o del Tallo

SD: Día Corto

SOC1: SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF
CONSTANS 1

STM: SHOOT MERISTEMLESS

SVP: SHORT VEGETATIVE PHASE

TFL1: TERMINAL FLOWER 1

TUB2: TUBULINA 2

UFO: UNUSUAL FLORAL ORGANS

WT: Silvestre

WUS: WUSCHEL