



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE
AGL17 EN EL DESARROLLO
RADICULAR DE *Arabidopsis thaliana*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**)

P R E S E N T A

GABRIEL SINUÉ FONSECA SALAZAR

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN

COMITÉ TUTOR: DRA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES

DR. JOSEPH DUBROVSKY

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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 14 de marzo de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **FONSECA SALAZAR GABRIEL SINUE** con número de cuenta **98050844** con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE AGL17 EN EL DESARROLLO RADICULAR DE *Arabidopsis Thaliana***", realizada bajo la dirección de la **DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN**:

Presidente: DRA. ALEJANDRA ALICIA COVARRUBIAS ROBLES
Vocal: DRA. MARÍA DEL ROCÍO CRUZ ORTEGA
Secretario: DRA. MA. ELENA ÁLVAREZ-BUYLLA ROCES
Suplente: DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA
Suplente: DR. JOSEPH DUBROVSKY JANCOVSKY

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de mayo de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para financiar mis estudios de posgrado.

Al financiamiento de los siguientes proyectos de investigación:

CONACYT No. 81542. “Papel de los genes MADS-box en la homeostasis celular. Meristemas de *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo”.

CONACYT No. 81433. “Transición a la floración en *Arabidopsis thaliana*: regulación genética y fisiológica”.

PAPIIT IN 229009-3: “Mecanismos moleculares y consecuencias morfogénicas del mantenimiento de nichos de células madres: *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo”.

PAPIIT IN 210408: “Papel de genes MADS-box preponderantemente de raíz en la regulación del tiempo de floración de *Arabidopsis thaliana*”.

A los miembros del Comité Tutor:

A la Dra. Berenice García Ponce de León por todas sus enseñanzas técnicas, teóricas y extra-académicas, así como su apoyo y paciencia durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces por el apoyo, la confianza y la retroalimentación académica durante mi estancia en su laboratorio.

Al Dr. Joseph Dubrovsky por todas sus sugerencias experimentales y enseñanzas conceptuales que me han hecho madurar como científico.

También agradezco a la Dra. Alejandra Covarrubias Robles, a la Dra. Rocío Cruz Ortega y al Dr. José Luis Reyes Taboada por los comentarios y sugerencias que enriquecieron esta tesis.

Asimismo, quiero agradecer al M. en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruíz por su apoyo y ayuda técnica en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi familia:

En primer lugar, agradezco infinitamente a mi mamá y mi papá: ustedes saben que sin su apoyo incondicional no habría optado por realizar un posgrado en ciencias.

A mi hermano: Alí, gracias por la compañía y todos los momentos divertidos, sin ellos el trabajo me habría abrumado muchas veces.

A mis compañeros del laboratorio de GeMoDEvo:

A mi querida Alma Piñeyro: sin tu amistad, el tiempo compartido y la retroalimentación académica, mi estancia en el laboratorio no habría sido tan agradable.

A mi querida Andrea Sanjuan: gracias por tu amistad, tu ayuda, tu confianza y todos los momentos compartidos fuera del laboratorio.

A mi querida Karla García y mi estimado David Cruz: ustedes saben que ya llevamos muchísimos años trabajando juntos en el quehacer científico, nuestros pininos en ciencia los hicimos juntos. Los quiero y ojalá trabajemos juntos nuevamente en el futuro.

También doy las gracias a Fabiola Jaimes, Adriana Garay, Rigoberto Pérez, Adriana Corvera, Aurora Gámez, Úrsula Abad, Mariana Benítez, Diana Romo, Gerardo Santos, Eugenio Azpeitia, Yara Sánchez, Mario Pacheco, Esther Zúñiga e Ileri Brumón, ya que sin ellos el laboratorio y el Instituto no habrían podido ser como una segunda casa para mí durante tantos años.

Sírvame el entendimiento
alguna vez de descanso,
y no siempre esté el ingenio
con el provecho encontrado.

* * *

Si es mío mi entendimiento
¿por qué siempre he de encontrarlo
tan torpe para el alivio,
tan agudo para el daño?

* * *

No es saber, saber hacer
discursos sutiles, vanos;
que el saber consiste sólo
en elegir lo más sano.

* * *

El ingenio es como el fuego:
que, con la materia ingrato,
tanto la consume más
cuanto él se ostenta más claro.

* * *

¿Qué loca ambición nos lleva
de nosotros olvidados?
Si es para vivir tan poco,
¿de qué sirve saber tanto?

* * *

Aprendamos a ignorar,
Pensamiento, pues hallamos
que cuanto añadido al discurso,
tanto le usurpo a los años.

Sor Juana Inés de la Cruz

A la inocencia del aprendiz de científico

ÍNDICE

1. Introducción	6
1.1. El desarrollo post-embionario de las plantas	6
1.2. La estructura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.3. El establecimiento y el mantenimiento del nicho de células troncales en el meristemo apical de la raíz	9
1.4. La regulación del ciclo celular en las plantas	13
1.5. Los genes MADS-box en el desarrollo de la raíz	19
2. Antecedentes	21
3. Objetivos	23
4. Materiales y Métodos	24
4.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	24
4.2. Selección de un nuevo alelo de pérdida de función de <i>AGL17</i> y genotipificación	25
4.3. Generación de mutantes dobles	26
4.4. Análisis fenotípico de la raíz	26
4.5. Análisis de la expresión genética por RT-PCR semicuantitativa	27
4.6. Análisis del tiempo de floración	27
5. Resultados	28
5.1. Expresión temporal de <i>AGL17</i> en la raíz	28
5.2. Efectos de la pérdida y la ganancia de función de <i>AGL17</i> en el crecimiento de la raíz primaria	28
5.3. Efectos de la pérdida y la ganancia de función de <i>AGL17</i> sobre algunos de los componentes que regulan el ciclo celular	31
5.4. Análisis de interacciones genéticas entre <i>AGL17</i> y <i>AGL16</i> , <i>AGL21</i> , <i>SOCI</i> y <i>ANRI</i> en el crecimiento de la raíz primaria	33
6. Discusión	36
6.1. <i>AGL17</i> es un represor del crecimiento de la raíz	36
6.2. Efecto de <i>AGL17</i> sobre algunos componentes que regulan la progresión del ciclo celular en la raíz	38

6.3. La combinatoria de las proteínas con dominio MADS en los complejos funcionales participa en regulación de la homeostasis del meristemo apical de la raíz	40
6.4. <i>AGL17</i> y <i>ANR1</i> no actúan redundantemente y existen relaciones genéticas complejas entre <i>AGL17</i> , <i>AGL16</i> , <i>AGL21</i> y <i>SOCI</i> durante el desarrollo de la raíz	43
6.5. <i>AGL17</i> es un promotor de la transición a la fase reproductiva (floración) y regula el desarrollo vegetativo en el vástago aéreo junto con <i>AGL21</i>	47
7. Conclusiones	50
8. Anexo 1: La transición a la floración: marco teórico y principales resultados del artículo: “ <i>AGAMOUS-LIKE 17</i> , a novel flowering promoter, acts in a <i>FT</i> -independent photoperiod pathway”	51
9. Anexo 2: Artículo: Han P, García-Ponce B, Fonseca-Salazar G, Álvarez-Buylla ER and Yu H. (2008). <i>AGAMOUS-LIKE 17</i> , a novel flowering promoter, acts in a <i>FT</i> -independent photoperiod pathway. <i>The Plant Journal</i> 55 : 253-265	57
10. Anexo 3: Análisis de la función de <i>AGL21</i> en el desarrollo vegetativo del vástago aéreo y en la transición a la floración. Análisis de redundancia funcional entre <i>AGL17</i> y <i>AGL21</i> en estos procesos	71
11. Anexo 4: Secuencias de los oligonucleótidos usados en la genotipificación y en los análisis de expresión genética por RT-PCR	73
12. Abreviaturas	75
13. Referencias	76

Índice de Figuras

Figura 1.	Estructura celular del meristemo de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 2.	Participación de la señalización de las proteínas CLAVATA en los meristemos apicales	11
Figura 3.	Representación esquemática del ciclo celular y de los eventos moleculares que regulan la progresión en las transiciones G1/S y G2/M	17
Figura 4.	Esquemización de la estructura genética de los genes estudiados	25
Figura 5.	Cinética de expresión semicuantitativa de <i>AGL17</i> en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
Figura 6.	Longitud de la raíz primaria a los 11 dps en plántulas completas y en raíces aisladas	30
Figura 7.	Longitud de la raíz primaria a los 11 dps en plántulas tratadas con β -estradiol	31
Figura 8.	Análisis de la expresión genética de algunos componentes de la regulación del ciclo celular	33
Figura 9.	Comparación de las medias de longitud de la raíz primaria de los mutantes dobles, los mutantes simples y la línea de tipo silvestre a los 7 y 10 dps	35
Figura 10.	Modelo combinatorio de la función represora de <i>AGL17</i> y las funciones activadoras de <i>AGL12</i> , <i>AGL14</i> y <i>AGL19</i> sobre el crecimiento de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	42
Figura 11.	Modelo combinatorio parcial de la formación de tetrámeros activadores y represores del crecimiento de la raíz entre proteínas con dominio MADS	46
Figura 12.	Inducción de la transición a la floración en <i>Arabidopsis</i> por el fotoperiodo de días largos	53
Figura 13.	Etapas de desarrollo en la que ocurre la transición a la floración en las líneas de pérdida de función <i>w-agl21</i> , <i>spm-agl21</i> , <i>gk-agl17</i> y en la mutante doble <i>spm-agl21</i> , <i>gk-agl17</i>	72

Resumen

Los genes MADS-box son componentes clave de los mecanismos que controlan la transición a la floración y la organogénesis de la flor, pero su papel en el desarrollo vegetativo ha sido poco estudiado. En esta tesis estudiamos el papel funcional del gene MADS-box *AGL17* en la regulación del crecimiento de la raíz primaria y en la homeostasis del meristemo apical de este órgano en *Arabidopsis thaliana*. Se analizó el fenotipo de dos líneas de pérdida de función de *AGL17* y se observó que presentan raíces más largas que las de tipo silvestre cuando éstas son separadas y crecidas aisladamente de la parte aérea. Debido a este fenotipo, se analizó la expresión de varios componentes del ciclo celular y se encontró que estas líneas presentan un aumento en la acumulación del ARNm de la ciclina B1;1, la cual es indispensable para la transición de G2 a M durante el ciclo celular. Complementariamente, una línea de ganancia de función de *AGL17* presentó raíces más cortas que las de tipo silvestre y una reducción en la acumulación del ARNm de la ciclina B1;1. Estos datos muestran que *AGL17* es un represor del crecimiento de la raíz regulando negativamente la proliferación celular en el meristemo apical, sin embargo, los fenotipos de la raíz de los mutantes dobles generados en este trabajo, *agl16 agl17*, *agl21 agl17* y *soc1 agl17*, sugieren que *AGL17* también podría participar como un activador del crecimiento de la raíz. Por lo tanto, proponemos que este gene podría tener una actividad dual en el crecimiento de la raíz y la especificidad de su función podría depender de los interactores proteicos con los que *AGL17* se asocia temporal y espacialmente.

Por otra parte, *AGL17* también desempeña el papel de promotor de la floración ya que las líneas de pérdida de función presentan un retraso en este proceso y las líneas de ganancia de función presentan una floración más temprana que las plantas de tipo silvestre. Esta parte del presente trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Hao Yu de la Universidad Nacional de Singapur y la publicación correspondiente se encuentra anexa a esta tesis. La contribución principal de este trabajo fue el hallazgo de que *AGL17* promueve la transición a la floración a través de la vía del fotoperiodo activando a los genes *API* y *LFY* en una vía paralela a *FT*.

Abstract

The MADS-box genes are key components of the mechanisms that control processes such as the flowering transition and floral organogenesis but their role in vegetative development have been poorly understood. In this thesis, the functional role of the MADS-box gene *AGL17* in the regulation of primary root growth and root apical meristem's activity of *Arabidopsis thaliana* is analyzed. Two loss-of-function mutations of *AGL17* showed longer roots than the wild type alleles when these organs were divided and grown in isolation from the shoot. Due to this phenotype, the expression of some cell cycle components was analyzed in these loss-of-function alleles and it was found an increment in the mRNA accumulation of *CYCB1;1*, which is important in the G2/M transition of the cell cycle. On the other hand, a gain-of-function allele of *AGL17* showed shorter roots and a reduction in the mRNA accumulation of *CYCB1;1* when compared with the wild type. These data suggest a repressor role of *AGL17* in the root growth by a negative regulation on meristem cell proliferation, however, the phenotypes of the double mutants *agl17 agl16*, *agl17 agl21* and *agl17 soc1* indicate that *AGL17* could also have a promoting role in root growth. So, we postulate that this gene could have a dual function during root growth and that the specificity of its function is achieved by the association with other proteins during the hetero-oligomerization of *AGL17* protein in a temporal and spatial fashion.

Besides its role in root growth, *AGL17* is also a flowering promoter as evidenced by the late and early flowering phenotypes of the loss-of-function and gain-of-function alleles, respectively. This part of the work was made in collaboration with Dr. Hao Yu of the National University of Singapore and the corresponding paper is attached to this thesis. The principal contribution of this work is the finding that *AGL17* promotes flowering transition through the photoperiod pathway by the activation of *API* and *LFY* acting in parallel to *FT*.

1. Introducción

1.1 El Desarrollo Post-Embrionario de las Plantas

El crecimiento es uno de los procesos más estudiados en los organismos multicelulares y décadas de investigación han llevado a una mejor comprensión de los mecanismos que generan la proliferación y la diferenciación celular, y de las señales que modulan estas actividades (particularmente en los sistemas animales); sin embargo, aún existen interrogantes y una de las más importantes es la manera en la que se coordinan el crecimiento con la morfogénesis durante el desarrollo de órganos funcionales. Tampoco se entiende con claridad las causas que generan la disrupción entre el crecimiento y la morfogénesis durante la formación de tumores. En las plantas raramente se presentan alteraciones equivalentes a los tumores observados en los animales, por lo que son un sistema de estudio adecuado para analizar los mecanismos que les permiten coordinar de manera robusta el crecimiento y la morfogénesis (Meyerowitz, 2002 ¹). Esta robustez está asociada en las plantas a una plasticidad y adaptabilidad excepcional, ya que su desarrollo post-embrionario continuo a lo largo de todo su ciclo de vida se va ajustando a los cambios que ocurren en las diferentes condiciones a las que se enfrentan. Por ello es que las plantas poseen un desarrollo reiterativo de nuevos órganos, a partir del plan corporal básico establecido durante la embriogénesis, que modifica constantemente la morfología de la planta adulta (Vernoux y Benfey, 2005 ²).

Una de las preguntas centrales en las áreas de la fisiología y el desarrollo vegetal ha sido cómo las plantas regulan su tasa de crecimiento. Sabemos que ésta varía de acuerdo al tipo de órgano, a la etapa del desarrollo y en la medida que la planta responde a distintos estímulos. Pero independientemente de esto, la tasa de crecimiento de un órgano está determinada por dos procesos interdependientes: la proliferación y el crecimiento celular. El crecimiento celular determina directamente la tasa de crecimiento de los órganos, pero la tasa de producción celular también influye en el crecimiento de los mismos al determinar el número de células que se expanden por unidad de tiempo. A su vez, el crecimiento celular es casi siempre un prerrequisito para que pueda llevarse a cabo la división celular (Beemster y Baskin, 1998 ³).

Como se ha mencionado, las plantas crecen y forman nuevos órganos durante todo su ciclo de vida. Estos tejidos y órganos post-embrionarios se derivan de células troncales pluripotenciales que residen en los meristemos. Éstos son grupos de células que se mantienen en un estado indiferenciado y de proliferación activa (Nakajima y Benfey, 2002⁴). Existen varios tipos de meristemos que contribuyen al desarrollo de la planta, los mejor estudiados son los dos meristemos primarios originados durante la embriogénesis, que corresponden a los meristemos apicales de la raíz y del vástago aéreo (RAM y SAM por sus siglas en inglés, respectivamente) que permiten el desarrollo y crecimiento de los órganos subterráneos y aéreos de la planta, respectivamente (Nakajima y Benfey, 2002⁴). Dentro de los meristemos se encuentran las células troncales de las que se originan todas las células y tejidos que forman los nuevos órganos y están situadas en un microambiente, el nicho de las células troncales, en el que la diferenciación celular es inhibida y la proliferación celular mantenida por señales intercelulares emitidas por las células cercanas (Vernoux y Benfey, 2005²). Las células derivadas de las divisiones de las células troncales que permanecen situadas en el nicho se mantienen en un estado indiferenciado, mientras que cualquier célula hija que sea desplazada fuera del nicho comienza un proceso de diferenciación celular en respuesta a señales posicionales (Tucker y Laux, 2007⁵).

1.2 La Estructura de la Raíz de Arabidopsis

La estructura general de la raíz a lo largo del eje ápico-basal puede ser dividida en cuatro zonas distintas que representan los diferentes estados de desarrollo de las células que las conforman: (1) la zona meristemática que se encuentra en la región más distal o apical de la raíz, en *Arabidopsis thaliana* tiene una longitud de alrededor de 250 micrómetros y contiene: a) en su extremo apical un grupo de células (el centro quiescente, CQ) con tasas bajas de proliferación, b) a las células troncales o iniciales de todos los tejidos de la raíz (con tasas de proliferación intermedias entre las células del CQ y las del meristemo proximal) y c) a un conjunto de células que descienden de éstas (el meristemo proximal) que se encuentran en un estado de proliferación máxima (van den Berg *et al.*, 1997⁶; Beemster y Baskin, 1998³; Figura 1). (2) La zona meristemática colinda en su parte basal con la zona de transición, la cual determina el destino de las células y la tasa de crecimiento

de la raíz al integrar la señalizaciones de estímulos endógenos y exógenos y traduciéndolos en respuestas de crecimiento adaptativas (Baluska *et al.*, 2010 ⁷). (3) La zona de alargamiento se yuxtapone basalmente a la de transición y, como su nombre indica, es el sitio en el que las células provenientes del meristemo dejan de dividirse para experimentar un rápido y extenso crecimiento anisométrico (Ivanov y Dubrovsky, 1997 ⁸; van der Weele *et al.*, 2003 ⁹). Por último, (4) la zona de maduración o de diferenciación está en la parte basal de la de alargamiento y es en ella donde las células cesan su crecimiento y adquieren su estado final de diferenciación (Dolan *et al.*, 1993 ¹⁰). Aunque el proceso de diferenciación se inicia cuando las células aún se encuentran en la zona de alargamiento, las células no adquieren su estado final de diferenciación hasta que alcanzan esta zona (Nakajima y Benfey, 2002 ⁴).

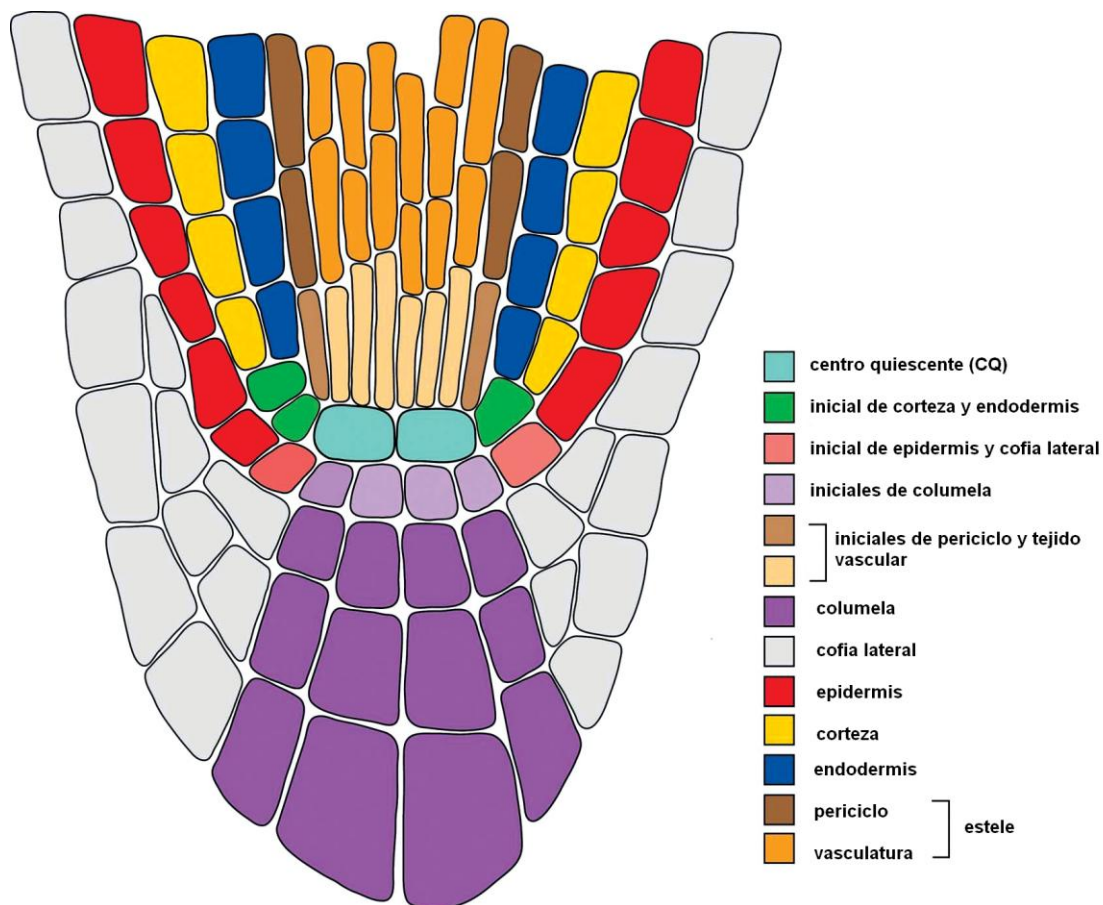


Figura 1. Estructura celular del meristemo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (modificado de Stahl y Simon, 2005 ¹¹).

Los tejidos concéntricos que forman la raíz de *Arabidopsis thaliana* tienen una capa de grosor y constituyen (del exterior al interior) la epidermis, la corteza, la endodermis y el cilindro central constituido por el periciclo y la vasculatura (Figura 1). El ápice de la raíz está cubierto por la cofia (constituida por la columela y la cofia lateral, Figura 1), que protege la zona meristemática de daños mecánicos a medida que la raíz crece y penetra al sustrato, además, es el lugar donde se percibe la gravedad y se generan las respuestas gravitrópicas. El origen ontogenético de todos estos tejidos puede rastrearse hasta cuatro tipos de células troncales o iniciales localizadas en la zona meristemática: las células iniciales de epidermis y cofia lateral, las de corteza y endodermis, las de columela (la parte más distal y central de la cofia) y las células iniciales del periciclo y el tejido vascular (Dolan *et al.*, 1993¹⁰). Al interior de las células iniciales y contactando físicamente a todas ellas, se encuentra el CQ u organizador, constituido por cuatro células centrales cuya función es mantener a las células iniciales en un estado indiferenciado (van den Berg *et al.*, 1997⁶; Scheres *et al.*, 2002¹²; Figura 1).

1.3 El Establecimiento y el Mantenimiento del Nicho de Células Troncales en el Meristemo Apical de la Raíz

La posición del CQ está determinada por la convergencia de dos señales independientes: la derivada de los genes *SCARECROW (SCR)* y *SHORT-ROOT (SHR)* (Sarkar *et al.*, 2007¹³), también involucrados en la determinación del eje radial de los tejidos de la raíz (Di Laurenzio *et al.*, 1996¹⁴; Helariutta *et al.*, 2000¹⁵; Sabatini *et al.*, 2003¹⁶), y la señal de los genes *PLETHORA (PLT)* que son activados por un incremento máximo local en la concentración de las auxinas (Aida *et al.*, 2004¹⁷; Xu *et al.*, 2006¹⁸) y que pueden causar duplicaciones del CQ cuando son expresados ectópicamente en la zona de alargamiento de la raíz (Galinha *et al.*, 2007¹⁹). SCR y SHR son proteínas de la familia GRAS de reguladores transcripcionales (Scheres *et al.*, 2002¹²), por su parte, las proteínas PLT son miembros de la familia AP2 de factores de transcripción (Aida *et al.*, 2004¹⁷). El aumento máximo en la concentración de las auxinas que se ha mencionado se mantiene a través de un flujo constante de esta hormona hacia el ápice de la raíz mediado por tres tipos de proteínas transportadoras: las proteínas PIN (PIN-FORMED) que constituyen canales de

eflujo de auxinas en forma aniónica (Blilou *et al.*, 2005²⁰), las proteínas de eflujo de la familia ABCB/PGP (ATP-binding cassette proteins/P-glicoproteins) y las proteínas de influjo de la familia AUX1/LAX (Zazimalová *et al.*, 2010²¹). Además de determinar la posición del CQ, los genes *PLT* especifican la identidad de los órganos de la raíz, ya que la pérdida de función en estos genes ocasiona la ausencia de la raíz embrionaria, mientras que su expresión ectópica en el vástago aéreo genera la aparición de raíces en este órgano (Aida *et al.*, 2004¹⁷).

La especificación de la identidad de las células iniciales ocurre coordinadamente con la especificación del CQ, tal como lo demuestran los experimentos de ablación y regeneración en donde el CQ es destruido con láser ocasionando la subsecuente diferenciación de las células iniciales (van den Berg *et al.*, 1997⁶), sin embargo, un nuevo CQ y el nicho de células troncales asociado con éste son especificados coordinadamente tiempo después de la ablación original (Xu *et al.*, 2006¹⁸). Por otra parte, el efecto inhibitorio del CQ sobre la diferenciación de las células iniciales está mediado por el gene *WOX5* (*WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5*, que codifica para un factor transcripcional que se expresa específicamente en el CQ) y muy posiblemente por otros factores aún desconocidos ya que los componentes genéticos descubiertos para la especificación del nicho de células troncales de la raíz no son suficientes para la diferenciación y mantenimiento de los tipos celulares del mismo (Azpeitia *et al.*, 2010²²). Las líneas de pérdida de función de *WOX5* presentan divisiones celulares atípicas y diferenciación prematura de las células de la columela, pero si este gene se expresa ectópicamente la diferenciación celular se retrasa (Sarkar *et al.*, 2007¹³).

El mantenimiento del nicho de células troncales es indispensable para el crecimiento continuo e indeterminado de un órgano, y en la raíz este proceso parece involucrar la acción de un grupo de proteínas extracelulares pequeñas de la familia CLE (*CLAVATA3/ESR-RELATED*), cuya función en el mantenimiento del nicho de células troncales en el meristemo del vástago aéreo está muy bien documentada (Tucker and Laux, 2007⁵; Miwa *et al.*, 2009²³). En la raíz, la sobre-expresión de *CLE19* y *CLE40* causa una reducción progresiva del meristemo apical (sin generar alteraciones en la identidad de las células iniciales o el CQ), debido a la reducción en la proliferación celular de las células meristemáticas y a su diferenciación prematura lo cual genera el crecimiento determinado

del órgano (Casamitjana-Martínez *et al.*, 2003²⁴; Fiers *et al.*, 2004²⁵; Stahl *et al.*, 2009²⁶). Por lo tanto, CLE19 y CLE40 controlan directamente el tamaño de la zona meristemática de la raíz (Figura 2), tal como sucede con CLAVATA3 (CLV3) en la parte aérea donde la expresión de WUSCHEL (WUS, el homólogo de WOX5) en el organizador (el análogo al CQ) regula positivamente la expresión de CLV3 en las células de la zona central del meristemo apical aéreo, lo cual, en un circuito de retroalimentación, regula negativamente la expresión de WUS en el organizador (Miwa *et al.*, 2009²³; Stahl y Simon, 2010²⁷; Figura 2).

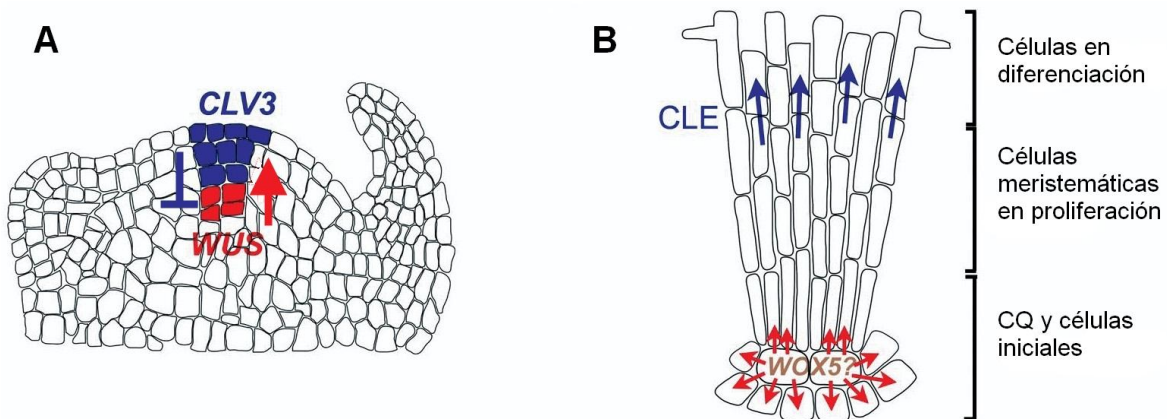


Figura 2. Participación de la señalización de las proteínas CLAVATA en los meristemos apicales. (A) En el meristemo apical aéreo, la expresión de WUS en el centro organizador induce la expresión de CLV3 en las células troncales de la zona central del meristemo, a su vez, CLV3 regula negativamente a WUS para restringir su expresión. (B) En la raíz, el CQ mantiene a las células iniciales adyacentes en su estado indiferenciado y este proceso podría estar mediado por WOX5, un gene relacionado con WUS. Por otra parte, la expresión de CLE19 y CLE40 promueve la diferenciación de las células meristemáticas al acercarse a la zona de alargamiento posiblemente a través de una vía de transducción parecida a la de CLV3. (Modificado de Stahl y Simon, 2005¹¹).

Como se ha mencionado, la región meristemática de la raíz comprende al nicho de células troncales (que presentan una tasa relativamente baja de proliferación celular) y también al conjunto de células descendientes que han originado más recientemente y que presentan una tasa de proliferación muy alta. Durante la transición de las células de la zona meristemática a la zona de alargamiento ocurre una reducción en la tasa de proliferación que eventualmente llega a cero y un aumento en la tasa de expansión celular que eventualmente también se detiene al llegar a la zona de maduración (Beemster y Baskin,

1998³). El reclutamiento de células que comienzan su diferenciación en la zona de alargamiento consumiría a la zona meristemática si la tasa de producción celular en el meristemo fuera menor a la tasa de diferenciación (Dello Ioio *et al.*, 2007²⁸). En las especies que presentan crecimiento determinado de la raíz primaria ocurre esto y se consume totalmente el RAM, sin embargo, en la mayor parte de las especies vegetales y en *Arabidopsis thaliana* particularmente, el crecimiento es indeterminado por lo que la tasa de células producidas en el meristemo por unidad de tiempo es igual a la tasa de células reclutadas para su diferenciación en la zona de alargamiento (a este balance es a lo que se le denomina “homeostasis del meristemo”), aunque aún sigue en discusión si las raíces de estas plantas continúan teniendo un meristemo funcional durante todo el periodo vital antes de llegar a la senescencia (Shishkova *et al.*, 2008²⁹). De cualquier manera, la coordinación entre la alta tasa de proliferación celular en las células meristemáticas más cercanas al nicho de células troncales y su posterior reducción al alcanzar la zona de alargamiento (concomitantemente al inicio de su diferenciación) constituye un punto de control fundamental en el crecimiento y desarrollo de la raíz.

Los procesos que controlan la proliferación y diferenciación celular están regulados en gran medida por hormonas que actúan como reguladores de la actividad meristemática (Sablowski, 2007³⁰). Las auxinas (que como ya se ha mencionado, alcanzan una concentración máxima en la región meristemática) tienen un papel central sobre la proliferación celular (Blilou *et al.*, 2005²⁰; ver la sección 1.4). Por otra parte, las citocininas antagonizan la función de las auxinas y la actividad meristemática de proliferación celular al promover la diferenciación celular en la raíz; y por ello, la aplicación exógena de citocininas disminuye el tamaño del meristemo (Dello Ioio *et al.*, 2007²⁸). Las citocininas también alteran el flujo de auxinas hacia la zona meristemática por que regulan a las proteínas PIN (Ruzicka *et al.*, 2009³¹) que son transportadores de las auxinas. Sin embargo, las citocininas también pueden estimular la proliferación celular y tienen efectos directos sobre componentes del ciclo celular (ver sección 1.4).

Otros factores que controlan la reducción de la tasa de proliferación y promueven la diferenciación celular son las mismas proteínas CLE19 y CLE40 descritas anteriormente y la proteína relacionada a Retinoblastoma (RBR), cuya reducción en expresión aumenta el número de las células iniciales, particularmente de la columela; contrariamente, su sobre-

expresión disminuye su número y promueve su diferenciación prematura (Wildwater *et al.*, 2005 ³²). Es notable que la secuencia y función del RBR está conservada en todos los eucariontes y en todos ellos es un componente esencial del mecanismo de control del ciclo celular (ver sección 1.4). De hecho, los resultados sintetizados en este trabajo muestran que la regulación del ciclo celular en la zona meristemática es determinante en el crecimiento de la raíz, como lo es en toda la planta.

1.4 La Regulación del Ciclo Celular en las Plantas

El ciclo celular es un mecanismo que regula las transiciones entre las distintas etapas celulares necesarias para que las células se dividan. Comprende la mitosis (M), la citocinesis, la interfase post-mitótica (G1), la fase de síntesis de ADN (S) y la interfase post-sintética (G2, Figura 3; Francis, 2007 ³³). Las células vegetales detienen su ciclo celular en G1 o G2 si se les priva de sacarosa o si son tratadas con inhibidores de la síntesis de proteínas (Van't Holf, 1966; Webster and Van't Holf, 1969 en Francis, 2007 ³³). Estas observaciones y otras hechas en células animales llevaron a la identificación de las transiciones G1/S y G2/M como los principales puntos de control del ciclo celular, determinando que la síntesis de proteínas es indispensable para la progresión de ambas transiciones y establecieron la naturaleza unidireccional de la progresión del ciclo (Van't Holf, 1973 en Francis, 2007 ³³, Gutiérrez, 2009 ³⁴). A nivel mecanicista, la regulación por fosforilación/desfosforilación de la actividad de proteínas particulares mediadas por las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) es una característica inherente importante para la progresión del ciclo celular. La actividad de las CDKs depende a su vez de sus interactores proteicos no catalíticos que son las ciclinas (Koff *et al.*, 1992 ³⁵).

En el genoma de *A. thaliana* existen 12 CDKs clasificadas en las clases A-F (Menges *et al.*, 2005 ³⁶), pero los miembros de las clases A y B han sido los más estudiados. Durante la transición G1/S, CDKA tiene un papel preponderante mientras que en la transición G2/M, CDKA coopera con CDKB en su regulación (Porceddu *et al.*, 2001 ³⁷). Además, CDKB es indispensable en las primeras etapas de la mitosis (Boudolf *et al.*, 2004 ³⁸). Por otra parte, CDKF actúa como una cinasa activadora de CDKs (CAKs) al

fosforilar a CDKA en un residuo de treonina que promueve el reconocimiento de sus sustratos (Shimotohno *et al.*, 2006³⁹).

Las ciclinas tienen una secuencia de 100 residuos de aminoácidos en promedio denominada “dominio ciclina” que es indispensable para su interacción con las CDKs (De Veylder *et al.*, 1997 en Francis 2007³³), y también presentan una secuencia susceptible a ubiquitinación que lleva a su degradación proteolítica (Genschik *et al.*, 1998⁴⁰; Weingartner *et al.*, 2004⁴¹; Planchais *et al.*, 2004⁴²). El genoma de *A. thaliana* codifica aproximadamente 60 ciclinas agrupadas en las clases A, B, C, D, H, P y T, pero en el contexto del ciclo celular las más estudiadas corresponden a algunos miembros de las clases A, B y D (Wang *et al.*, 2004⁴³; Vandepoele *et al.*, 2002⁴⁴; Francis, 2007³³; Gutiérrez, 2009³⁴). La expresión de las ciclinas D es relativamente constante durante el ciclo celular, en cambio, la expresión de las ciclinas A y B presentan grandes oscilaciones: las ciclinas A comienzan a expresarse en la transición G1/S, alcanzan un máximo en su expresión durante las fases S y G2 que declina en las primeras fases de la mitosis hasta desaparecer. Algo similar ocurre con las ciclinas B: su expresión inicia rápidamente en las etapas finales de G2 alcanzando un pico máximo en la transición G2/M que declina durante las primeras etapas de la mitosis y desaparece después de la metafase (Ito, 2000⁴⁵).

La actividad de los complejos ciclina-CDK es inhibida por las proteínas KRP/ ICK (proteína relacionada a Kip/interactor de la cinasa cdc2). Se han descrito 7 genes para esta familia de inhibidores en *A. thaliana* y todos ellos interactúan con las ciclinas de la clase D (Wang *et al.*, 1997⁴⁶; Lui *et al.*, 2000⁴⁷; De Veylder *et al.*, 2001⁴⁸; Zhou *et al.*, 2003⁴⁹). Esta interacción promueve la inhibición de los complejos CDKA-CYCD3, CDKA-CYCD2 y CDKB-CYCD2 por KRP1 y KRP2 (Wang *et al.*, 1998⁵⁰; Nakai *et al.*, 2006⁵¹). Cuando estos inhibidores son sobre-expresados generan reducciones en la talla de los órganos de la planta al bloquear la proliferación celular en la transición G2/M pero permitiendo la progresión de la fase S, lo cual promueve la endoreduplicación, que es la síntesis de ADN en ciclos consecutivos sin división celular generando células poliploides (Wang *et al.*, 2000⁵²). KRP2 también está involucrado en la interrupción de la transición G1/S en las células del periciclo que originan las raíces laterales y la inhibición de este factor parece ser un requisito para la iniciación de estos órganos (Himanen *et al.*, 2002⁵³). La actividad de los

KRPs puede regularse a nivel transcripcional (ver más adelante) o por degradación mediada por ubiquitinación, al menos para el caso de KRP6 y KRP7 (Kim *et al.*, 2008⁵⁴).

Otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular son los miembros de las familias de factores transcripcionales E2F (adenovirus E2 promoter-binding factor) y DP (dimerization partner) además de RBR. En *A. thaliana* existen 6 genes que codifican para proteínas E2F (a-f) y dos para proteínas DP. E2Fa, E2Fb y E2Fc requieren heterodimerizarse ya sea con DPa o DPb para llevar a cabo su función mientras que E2Fd, E2Fe y E2Ff actúan independientemente de las proteínas DP (Ramírez-Parra y Gutiérrez, 2000⁵⁵; Ramírez-Parra *et al.*, 2007 en Gutiérrez, 2009³⁴). Estos factores regulan la expresión de los genes que se requieren en la fase S del ciclo celular para la replicación del ADN (de Jager *et al.*, 2001⁵⁶; Stevens *et al.*, 2002⁵⁷; Ramírez-Parra *et al.*, 2003⁵⁸; Díaz-Trivino *et al.*, 2005⁵⁹) y de otros componentes necesarios en etapas posteriores del ciclo celular como CDKB1;1 (Bouldolf *et al.*, 2004³⁸). Por otra parte, RBR (que cuenta con un solo miembro en dicotiledóneas, Lendvai *et al.*, 2007⁶⁰) es un regulador negativo que bloquea la acción de los factores E2F-DP al interactuar con ellos físicamente (Uemukai *et al.*, 2005⁶¹) y en consecuencia, inhibe la progresión del ciclo celular arrestándolo en la transición G1/S. Como se mencionó anteriormente, RBR también limita el número de divisiones de las células iniciales de la raíz, en particular las de columela y promueve su diferenciación (Wildwater *et al.*, 2005³²).

Durante la transición G1/S (Figura 3), CDKA-CYCD constituye el principal complejo cinasa-ciclina necesario para la progresión en este punto de control del ciclo celular (Gutiérrez *et al.*, 2002⁶²; Menges *et al.*, 2006⁶³; Inzé y De Veylder, 2006⁶⁴). Uno de los principales blancos de CDKA-CYCD es la proteína RBR, (Boniotti y Gutiérrez, 2001⁶⁵; Nakagami *et al.*, 2002⁶⁶). La fosforilación de RBR promueve su disociación de los factores E2F-DP lo que permite la activación de los genes blanco de estos factores: E2Fa y E2Fb actúan como activadores transcripcionales que promueven la proliferación celular al activar la expresión de los genes cuyos productos son necesarios para la síntesis del ADN (Stevens *et al.*, 2002⁵⁷; Rossignol *et al.*, 2002⁶⁷; Bouldolf *et al.*, 2004³⁸; Sozzani *et al.*, 2006⁶⁸; Inzé y De Veylder, 2006⁶⁴; de Jager *et al.*, 2009⁶⁹). Por otra parte, el heterodímero E2Fc-DPb es un represor transcripcional cuando se encuentra asociado a RBR pero cuando éste se disocia, E2Fc-DPb pierde la afinidad por sus genes blanco lo cual permite la

transcripción de éstos (de Jager *et al.*, 2009⁶⁹). El complejo E2Fc-DPb también es regulado negativamente por SKP2A, una proteína con caja F que ubiquitina tanto a E2Fc como a DPb para su degradación (del Pozo *et al.*, 2002⁷⁰; del Pozo *et al.*, 2006⁷¹).

Una serie de eventos parecidos ocurren durante la transición G2/M (Figura 3): en este proceso son necesarios tanto CDKA como CDKB (cuya expresión depende del heterodímero E2Fa-DPa, Boudolf *et al.*, 2004³⁸). Antes de que puedan fosforilar a sus proteínas blanco que dirigen el inicio de la mitosis, CDKA y CDKB deben activarse mediante la asociación con las ciclinas tipo D, A y particularmente con las B (Kono *et al.*, 2003⁷²; Inzé y De Veylder, 2006⁶⁴) y además deben ser fosforiladas por las CAKs (CDKF, por ejemplo, Shimotohno *et al.*, 2006³⁹). Boudolf y colaboradores han propuesto que CDKB asociado a una ciclina B podría fosforilar a KRP2 que se disociaría del complejo CDKA-CYCB el cual pasaría a su estado activo (Verkest *et al.*, 2005⁷³; Boudolf *et al.*, 2006⁷⁴). También la acción de algunas fosfatasas como CDC25 y WEE1 podrían promover la activación de las CDKs durante la transición G2/M tal y como lo hacen sus homólogos en animales y levaduras (Kellogg, 2003⁷⁵; Boutros *et al.*, 2006⁷⁶), sin embargo, aún no existe consenso sobre la verdadera función de estas fosfatasas en el ciclo celular de las plantas (Boudolf *et al.*, 2006⁷⁴; Francis, 2007³³). Una vez que han sido activadas (ya sea CDKA en solitario o en colaboración con CDKB), las CDKs fosforilan a varios factores transcripcionales específicos de la transición G2/M, entre los que se encuentran algunos factores transcripcionales MYB que a su vez activan la transcripción de otros genes necesarios en la transición G2/M (Ito *et al.*, 2001⁷⁷; Araki *et al.*, 2004⁷⁸). Esta cascada de activación transcripcional iniciada por las CDKs genera la progresión hacia la fase de mitosis.

importante durante la fotomorfogénesis (del Pozo *et al.*, 2002⁷⁰; del Pozo *et al.*, 2006⁷¹). Además, tanto las auxinas como las citocininas promueven la transición en G2/M regulando positivamente la expresión de CDKB y negativamente la expresión de KRP1 y KRP2 probablemente a través de PROPORZ1 (PRZ1), una posible proteína adaptadora de factores de transcripción (Himanen *et al.*, 2002⁵³; Sieberer *et al.*, 2003⁸¹). Las auxinas también regulan la expresión de CYCA2;1 (Bursens *et al.*, 2000⁸²) y podrían regular la expresión de CYCB1;1 a través de los genes PLT (Aida *et al.*, 2004¹⁷). La inhibición y activación de la expresión de los KRPs y de los componentes del complejo CDKB-CYCB, respectivamente, promueven la activación de CDKA tanto en la transición G1/S como en G2/M. Por otra parte, las citocininas regulan positivamente la transcripción de CYCD3;1 (Soni *et al.*, 1995⁸³) que es indispensable en la transición G1/S, y promueven la activación de CDKA en la transición G2/M (Zhang *et al.*, 1996 en Gutiérrez, 2009³⁴).

Actuando antagónicamente a las hormonas anteriores está el ácido abscísico (ABA), el cual induce el arresto del ciclo celular en la transición G1/S (Swiatek *et al.*, 2002⁸⁴) debido a la represión que ejerce sobre la expresión de CDKA (Hemerly *et al.*, 1993⁸⁵) a través de la activación transcripcional del inhibidor KRP1 (Wang *et al.*, 1998⁵⁰).

El papel del resto de las hormonas en la regulación del ciclo celular ha sido mucho menos estudiado, pero para todas ellas se han encontrado indicios que las involucran en la regulación de este proceso: el ácido giberélico (GA) promueve la división celular (Asahina *et al.*, 2002⁸⁶) a través de la activación de la expresión de CDKA y CDKB y algunas ciclinas mitóticas (probablemente de los tipos A y B, Sauter, 1997⁸⁷; Fabian *et al.*, 2000⁸⁸). El etileno también promueve la división celular (Kazama *et al.*, 2004⁸⁹; Ortega-Martínez, 2007⁹⁰; Love *et al.*, 2009⁹¹) al igual que los brasinoesteroides al promover la expresión de una CYCD3 (Hu *et al.*, 2000⁹²). Por último, el ácido jasmónico inhibe la división celular a través de la regulación negativa sobre CYCB1;2 (Swiatek *et al.*, 2002⁸⁴; Zhang y Turner, 2008⁹³).

Aunque se conocen desde hace décadas los efectos de las hormonas “clásicas” sobre la progresión del ciclo celular, se sabe muy poco de los factores que integran la señalización hormonal y algunos estímulos ambientales (la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo) y que orquestan la regulación de los componentes del ciclo celular. El laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas (GeMoDEvo), en donde se

realizó esta tesis, lleva a cabo un esfuerzo importante a estudiar dicha integración. En este contexto, los genes de la familia MADS-box parecen ser componentes importantes de estos factores integradores. De hecho, recientemente se han empezado a caracterizar funcionalmente algunos de estos genes que ciertamente parecen ser algunos de los componentes claves de estas redes genéticas integradoras y orquestadoras. *XAANTALI* (*XALI/AGL12*), cuya expresión es inducida por las auxinas (Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴), es un gene MADS-box importante en la proliferación celular del meristemo apical de la raíz, y otros datos recientes del laboratorio sugieren que este gene regula directamente a algunos de los genes claves en la modulación de las transiciones entre las distintas fases del ciclo celular (Karla García y Berenice García, datos no publicados).

1.5 Los Genes MADS-box en el Desarrollo de la Raíz

La familia de factores de transcripción MADS-box (acrónimo de *MCM1*, *AGAMOUS*, *DEFICIENS* y *SERUM_RESPONSE FACTOR*, los cuatro primeros miembros descritos, Schwarz-Sommer *et al.*, 1990⁹⁵) está formada por más de 100 miembros en *Arabidopsis thaliana* (Parenicova *et al.*, 2003⁹⁶; Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003⁹⁷). Existen dos linajes principales de genes MADS-box: los tipo I y los tipo II (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000⁹⁸). Las proteínas del tipo II en plantas presentan cuatro dominios: el dominio MADS de 56 aminoácidos hacia el extremo amino-terminal que se une al ADN, un dominio I (intervening) con menor grado de conservación entre los miembros, el dominio K (keratin-like) que participa en la dimerización, y la región carboxilo-terminal que también es variable pero colabora en los procesos de transactivación. Por esta estructura modular, se dice que los genes MADS-box del tipo II en plantas presentan una estructura MIKC (de Bodt *et al.*, 2003⁹⁹).

Los genes MADS-box del tipo II mejor caracterizados son los involucrados en el desarrollo floral, en la regulación del tiempo de la floración y otros aspectos de la fase reproductiva del desarrollo (Komeda, 2004¹⁰⁰; Parcy, 2005¹⁰¹; Álvarez-Buylla *et al.*, 2010¹⁰²), pero también hay subgrupos de genes MADS-box que se expresan ampliamente en los tejidos vegetativos, incluyendo la raíz (Álvarez-Buylla *et al.*, 2000¹⁰³; Burgeff, 2001¹⁰⁴; Burgeff *et al.*, 2002¹⁰⁵). Entre estos, *XALI/AGL12* promueve la proliferación de las células

meristemáticas y la pérdida de su función tiene implicaciones dramáticas en el crecimiento de la raíz de *A. thaliana* (Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴). Otros genes estudiados en el laboratorio de GeMoDEvo son *AGL14* y *AGL19* y también parecen ser necesarios para la proliferación celular normal y el mantenimiento del nicho de células troncales en el meristemo apical de la raíz de *A. thaliana*, ya que la pérdida de función de estos genes da como resultado raíces primarias cortas y diferenciación prematura de las células iniciales, en particular de la columela (Garay-Arroyo *et al.*, Jaimes-Miranda *et al.*, datos no publicados). En esta tesis nos enfocamos en otro gene MADS-box, *AGAMOUS-LIKE 17* (*AGL17*), que también parece ser clave en la regulación del meristemo de raíz de *Arabidopsis thaliana*.

2. Antecedentes

AGL17 es un gene MADS-box del tipo II que se expresa en la raíz, particularmente en el CQ y en la cofia lateral (Nawy *et al.*, 2005¹⁰⁶; Burgeff *et al.*, 2002¹⁰⁵).

En el laboratorio de GeMoDEvo contamos con varios alelos de pérdida de función de *AGL17* y trabajos previos con uno de ellos (*w-agl17*, datos no publicados de Úrsula Flores e Ignacio Tlatelpa) mostraron evidencia de que la pérdida de función de este gene promueve un aumento sutil en el crecimiento de la raíz si la concentración de sales nutritivas (Murashige y Skoog) en el medio de cultivo es superior al 0.2X normalmente utilizado (Álvarez-Buylla, comunicación personal).

Este fenotipo sugiere que *AGL17* regula negativamente el crecimiento de la raíz y podría ejercer su función sobre la proliferación celular en el meristemo tal como se ha demostrado para los otros genes de esta familia citados arriba: *AGL12*, *AGL14* y *AGL19* (Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴; Garay-Arroyo *et al.*, Jaimes-Miranda *et al.*, manuscritos en preparación).

Por otro lado, las proteínas con dominio MADS con estructura MICK se asocian entre sí en dímeros y tetrámeros que constituyen las formas funcionales (Davies *et al.*, 1996¹⁰⁷; Fan *et al.*, 1997¹⁰⁸; Kaufmann *et al.*, 2005¹⁰⁹). *AGL17* puede dimerizarse con *AGL16*, *AGL21* y *SOC1* (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰), por lo que es posible que *AGL17* requiera de la presencia de estas tres proteínas para llevar a cabo su función. De modo que la pérdida de función simultánea de *AGL17* y la de alguno de estos tres genes podría tener efectos sumatorios que permitan evidenciar con mayor claridad la función de *AGL17*. Por otra parte, *ANR1* es otra proteína con dominio MADS que presenta una alta similitud con *AGL17* (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003⁹⁷), y también interactúa exclusivamente con *AGL16*, *AGL21* y *SOC1* (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰), por lo que podría sustituir funcionalmente a *AGL17*.

Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el papel de *AGL17* durante el desarrollo de la raíz primaria de *A. thaliana* planteándonos la siguiente hipótesis:

Si el mutante de pérdida de función de *AGL17* presenta una raíz más larga que las plantas de tipo silvestre, *AGL17* podría estar participando como un represor del crecimiento de la raíz.

3. Objetivos

Objetivo General

Caracterizar el papel de *AGL17* durante el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos Particulares

1. Analizar la expresión temporal de *AGL17* en las etapas tempranas del desarrollo de la raíz.
2. Determinar los efectos de la pérdida y la ganancia de función de *AGL17* sobre el crecimiento de la raíz primaria.
3. Determinar los efectos de la pérdida y la ganancia de función de *AGL17* sobre la expresión de algunos reguladores de la progresión del ciclo celular.
4. Analizar la existencia de interacciones genéticas entre *AGL17* y *AGL16*, *AGL21*, *SOC1* y *ANR1* en el crecimiento de la raíz primaria.
5. Caracterizar el papel de *AGL17* durante la transición a la floración (ver los anexos 1 y 2).

4. Materiales y Métodos

4.1 Material Vegetal y Condiciones de Crecimiento.

Se utilizó una línea de tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 y dos alelos de pérdida de función de *AGL17*: *w-agl17* (E. Wisman 17.3-2; Baumann *et al.*, 1998¹¹¹) y *gk-agl17* (NASC N429190). Además de las líneas *agl16* (Salk_104701), *w-agl21* (E. Wisman 21.5-25; Baumann *et al.*, 1998¹¹¹), *spm-agl21* (B. Forde), *soc1* (Salk_138131), *anr1-2* (Salk_015348), *spm-anr1* (B. Forde, Gan *et al.*, 2005¹¹²; ver Figura 4) y dos líneas de ganancia de función de *AGL17*, una constitutiva y una inducible por β -estradiol (35S::*AGL17* y pER22-*AGL17*, respectivamente) que fueron proporcionadas por el Dr. Hao Yu (Han *et al.*, 2008¹¹³ y Zuo *et al.*, 2000¹¹⁴). Todas las líneas mencionadas pertenecen al ecotipo Col-0.

Las semillas fueron esterilizadas y estratificadas a 4 °C de acuerdo a Fonseca, (2007)¹¹⁵. Las plántulas fueron crecidas asépticamente en placas verticales con medio de cultivo sólido que contiene 0.2X de sales Murashige y Skoog (MS), 1% de sacarosa (2% para los experimentos con raíces aisladas) y 1% de agar. Se mantuvieron en una cámara ambiental (Conviron modelo E15) a 22-24 °C con un flujo de fotones fotosintéticos (PPF) de 87.8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz fría fluorescente bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad.

Para la inducción con estradiol, las plántulas de la línea pER22-*AGL17* fueron rociadas hasta que la radícula fue completamente cubierta con medio MS líquido al 0.2X suplementado con β -estradiol (en dimetil-sulfóxido, DMSO) a una concentración final de 15 μM cada 24 horas durante los tiempos especificados (ver resultados). Para el tratamiento control se usó DMSO añadido en volúmenes iguales a los usados con β -estradiol.

En los experimentos de determinación del tiempo de floración, las semillas se estratificaron manteniéndolas en agua bidestilada a 4 °C durante 72 horas para posteriormente sembrarlas directamente sobre una mezcla de suelo comercial (SunGRO Metro-mix 200, Scotts, Inc.) y agrolita (1:1). Se mantuvieron en cámaras o cuartos con ambiente controlado con las condiciones de temperatura, intensidad luminosa y fotoperiodo descrito anteriormente.

5'-CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC-3'), el T-DNA de Salk (LBb1: 5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'), el transposón En-1 (EN-205: 5'-AGAAGCACGACGGCTGTAGAATAGGA-3') y el transposón Spm (SPM8: 5'-GTTTTGGCCGACACTCCTTACC-3').

4.3 Generación de mutantes dobles

Se utilizaron plantas homocigotas para llevar a cabo las cruzas. Para ello el polen de las flores donadoras (“masculinas”) fue aplicado directamente sobre el estigma de los pistilos de las flores receptoras (“femenina”) a las que previamente se les había retirado manualmente el perianto y el androceo. Las plantas con los pistilos así polinizados fueron colocadas en las condiciones de crecimiento mencionadas anteriormente. Los frutos ya secos y dehiscentes producidos por estas cruzas fueron colectados individualmente, algunas semillas (de 4 a 8, generación F₁) de estos frutos fueron germinadas y las plántulas cultivadas en medio MS sólido como se describió anteriormente. Aproximadamente a los 10 días posteriores a la siembra (dps), las plantas fueron transplantadas al sustrato de suelo:agrolita mencionado y llegado el momento se les permitió autopolinizarse. Todo el proceso se repitió para la siguiente generación (F₂) usando al menos 20 semillas. Alrededor de los 20 dps, las plantas fueron genotipificadas como se ha descrito en la sección 4.2 y se seleccionaron aquellas que fueron homocigotas para los dos alelos de pérdida de función.

4.4 Análisis fenotípico de la raíz

Se determinó la longitud de la raíz primaria en los tiempos de desarrollo indicados en *Resultados* utilizando un vernier digital (Calibrador DIGIMATIC modelo CD-6” C5, Mitutoyo corp.). El análisis estadístico de los datos se realizó con el software JMP Statistical Discovery.

4.5 Análisis de la expresión genética por RT-PCR semicuantitativa

Se aisló ARN total de tejido de raíz o de vástago aéreo por separado usando TRIzol® Reagent (Invitrogen™) de la manera señalada en Fonseca, (2007) ¹¹⁴. La síntesis del ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo con la enzima SuperScript™ Reverse Transcriptase II (Invitrogen™) utilizando 500 ng de ARN y el oligonucleótido 5'GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT3' como cebador de la región de poli-adeninas de los ARN mensajeros. Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Las condiciones de amplificación y la secuencia de los oligonucleótidos cebadores se describen en el Anexo 4.

4.6 Análisis del tiempo de floración

El tiempo de floración fue determinado con dos parámetros: (1) el número de dps requeridos para que el tallo alcance una altura de 1 cm y (2) el número total de hojas de la roseta (que incluyen tanto las hojas completamente expandidas como las hojas en expansión) presentes cuando el tallo alcanzó la longitud mencionada. El análisis estadístico de los datos se realizó con el software JMP Statistical Discovery.

5. Resultados

5.1 Expresión Temporal de AGL17 en la Raíz

Se examinó el patrón de expresión temporal de *AGL17* en la raíz de *Arabidopsis thaliana* mediante un análisis de RT-PCR. Para ello se purificó ARN total de la raíz a los 5, 10 y 15 dps y se llevó a cabo la amplificación de *AGL17* como se describe en los métodos. La expresión de *AGL17* presenta un incremento del 50 % a los 10 dps con respecto a la expresión de los 5 dps. Posteriormente, la expresión parece mantenerse constante hasta los 15 dps (Figura 5).

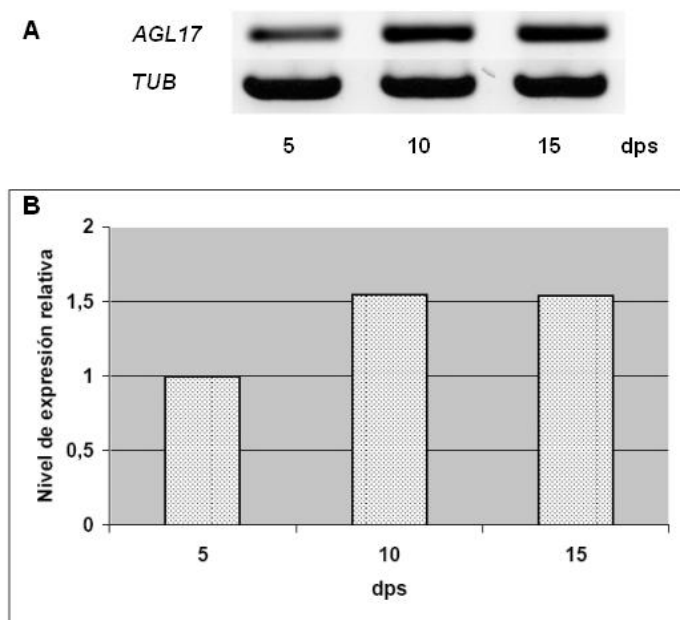


Figura 5. Cinética de expresión semi-cuantitativa de *AGL17* en la raíz de *Arabidopsis thaliana* analizada por RT-PCR (A). Representación gráfica de los niveles de expresión en cada etapa de acuerdo a la intensidad relativa de las señales (B). Número de experimentos independientes = 3.

5.2 Efectos de la Pérdida y la Ganancia de Función de AGL17 en el Crecimiento de la Raíz Primaria

AGL17 es uno de los genes MADS-box que se expresa en la raíz (Burgeff *et al.*, 2002¹⁰⁵; Nawy *et al.*, 2005¹⁰⁶ y sección 5.1). Para caracterizar este gene a nivel funcional

se utilizó un enfoque de genética reversa: analizando el fenotipo de la raíz de dos líneas de pérdida de función y una de ganancia de función. La línea homocigota de pérdida de función *gk-agl17*, que presenta una inserción de T-DNA en el cuarto exón, fue seleccionada a partir de la generación F₂ mediante pruebas de resistencia a sulfadiazina y por genotipificación con oligonucleótidos específicos para *AGL17* y para el T-DNA de la inserción (ver Figura 4, métodos y anexo 4). Como era de esperarse, la expresión de *AGL17* a nivel de ARNm es nula en esta línea (ver sección 5.3 y Figura 8).

Se crecieron las dos líneas de pérdida de función *w-agl17* y *gk-agl17* además de la línea de ganancia de función (35S:AGL17) en las condiciones estándar utilizadas en el laboratorio (sales MS 0.2X y sacarosa 1%) y en algunas ocasiones se observó que las líneas de pérdida de función crecían un poco más (datos no mostrados), pero resultaba difícil reproducir estas observaciones. Debido a esto, el Dr. Dubrovsky sugirió observar y cuantificar el crecimiento de la raíz aislando a este órgano de la parte aérea con la finalidad de evitar que el transporte de hormonas y productos de la fotosíntesis de la parte aérea pudieran enmascarar o compensar las deficiencias genéticas del desarrollo de la raíz. Bajo estas condiciones, se pudo observar que las líneas de pérdida de función presentan una raíz primaria más larga que la línea de tipo silvestre, y de forma inversa, la línea de ganancia de función presenta una raíz más corta que la de tipo silvestre (Figura 6B), comparadas con las plántulas completas (Figura 6A). Estos resultados sugieren un papel represor de *AGL17* en el crecimiento de la raíz primaria que puede ser parcialmente compensado por los aportes del vástago aéreo (ver Discusión).

Para corroborar el papel represor de *AGL17* en el crecimiento de la raíz se indujo la sobre-expresión de este gene en una línea transgénica que contiene una construcción inducible con estradiol que activa la sobre-expresión de *AGL17* (pER22-AGL17, ver métodos) tanto en plántulas completas como en raíces aisladas. Por una parte, las plántulas de 2 dps de edad de las líneas de tipo silvestre y transgénica inducible se trataron con β -estradiol o con un volumen igual de DMSO como placebo cada 24 horas hasta los 11 dps. En este caso se encontró que la raíz primaria de la línea transgénica inducida con β -estradiol fue más corta que la de tipo silvestre tratada con estradiol y que los controles tratados con el placebo (Figura 7A). Además, se aislaron raíces a los 4 dps de la línea de tipo silvestre y de la transgénica inducible y se trataron con β -estradiol o con el placebo

cada 24 horas hasta los 10 dps, se cuantificó el incremento en la longitud de la raíz primaria y se encontró un menor incremento en la longitud de las raíces aisladas de la línea transgénica inducida que en las raíces de la línea de tipo silvestre tratada con β -estradiol y que en los controles tratados con el placebo (Figura 7B). Se llevó a cabo un análisis por RT-PCR para corroborar que el tratamiento de la línea transgénica con β -estradiol realmente promueve la sobre-expresión de *AGL17* (ver sección 5.3 y Figura 8B), por lo que estos resultados demuestran que la sobre-expresión de *AGL17* en la línea transgénica inducible inhibe el desarrollo de la raíz primaria. Este gen es el primero de la familia MADS-box que tiene un efecto inhibitor más que activador, sobre el crecimiento de la raíz.

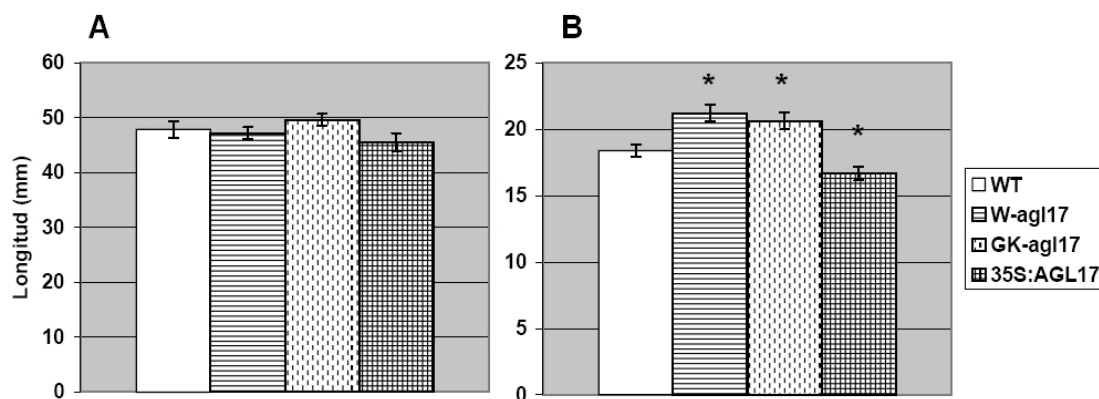


Figura 6. Longitud de la raíz primaria a los 11 dps en plántulas completas (A) y en raíces aisladas (B). En B las raíces se aislaron de la parte aérea a los 4 dps y tanto éstas como las plántulas completas en A fueron cultivadas en medio MS 0.2X con 2% de sacarosa bajo un régimen de fotoperiodo largo (16 hrs luz : 8 hrs oscuridad). Las barras con asteriscos (*) representan medias significativamente diferentes ($P < 0.05$) de la media de las plantas de tipo silvestre (WT) de acuerdo a la prueba de Mann-Whitney. $N = 10-21$ (A) y $20-28$ (B). Las líneas en la parte superior de cada barra representan el error estándar. Nótese las diferencias en la escala entre A y B. Número de experimentos independientes = 2.

Para determinar si el efecto de la sobre-expresión de *AGL17* en la raíz depende de la etapa de desarrollo en la que se induce la sobre-expresión o de la duración total de la sobre-expresión, se llevaron a cabo una serie de experimentos de inducción con β -estradiol en tres diferentes “ventanas” (momentos) del desarrollo de la raíz primaria de acuerdo al trabajo de Beemster y Baskin, (1998)³: 4 a 6 dps, 6 a 8 dps y 8 a 10 dps. En cada caso, el aislamiento de las raíces y el tratamiento se inició al comienzo de cada ventana de desarrollo (4, 6 y 8 dps, respectivamente). El β -estradiol o el placebo fueron suministrados cada 24 horas y se

cuantificó el incremento en la longitud de la raíz primaria al final del periodo de cada ventana de desarrollo (6, 8 y 10 dps, respectivamente). No se encontraron diferencias en el incremento de la longitud de la raíz primaria en ningún caso (datos no mostrados), salvo cuando la inducción con β -estradiol se llevó a cabo constantemente cada 24 horas a partir de los 4 dps hasta los 10 dps (Figura 7B), por lo que la inhibición del crecimiento de la raíz primaria se debe a la sobre-expresión continua de *AGL17* de los 4 a los 10 dps y no al efecto de esta sobre-expresión en un periodo determinado (ventana) del desarrollo temprano de la raíz.

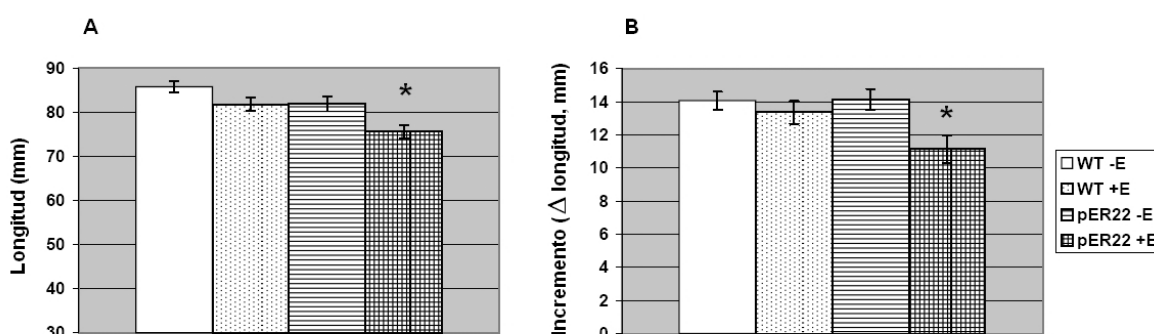


Figura 7. (A) Longitud de la raíz primaria a los 11 dps en plántulas tratadas con β -estradiol (+E) o con DMSO como placebo (-E). (B) Incremento de los 4 a los 10 dps en la longitud de raíces primarias aisladas bajo tratamiento con estradiol o con el placebo. Las barras con asteriscos (*) representan medias significativamente diferentes ($P < 0.05$) de la media de las plantas de tipo silvestre (WT) de acuerdo a la prueba de Mann-Whitney. $N = 32-40$ (A) y $23-29$ (B). Las líneas en la parte superior de cada barra representan el error estándar. Nótese la diferencia en la escala entre A y B. Número de experimentos independientes = 3.

5.3 Efectos de la Pérdida y la Ganancia de Función de *AGL17* sobre Algunos de los Componentes que Regulan el Ciclo Celular

Los fenotipos de la raíz de las líneas de pérdida y de ganancia de función de *AGL17* sugieren que este gene participa en la regulación del crecimiento de este órgano, y el crecimiento de la raíz primaria depende exclusivamente de dos factores: la tasa de proliferación celular en el meristemo apical y de la tasa de crecimiento celular en la zona de alargamiento de la raíz. Debido a que no se encontraron diferencias a nivel celular entre el meristemo de los alelos de pérdida de función de *AGL17* y el wt (desarreglos en la

estructura del meristemo o cambios en el tamaño de las células maduras, datos no mostrados), se decidió analizar indirectamente a la proliferación celular. Ésta depende directamente de la regulación del ciclo celular por lo que el análisis de la regulación transcripcional de las ciclinas es un buen indicador de las alteraciones en el ciclo celular y por lo tanto de la proliferación celular y el crecimiento (Ito, 2000⁴⁵). Por esta razón, se decidió analizar los efectos de la ganancia y la pérdida de función de *AGL17* sobre la acumulación del ARN mensajero de algunos miembros representativos de las familias de ciclinas que se han asociado directamente con la progresión del ciclo celular: *CYCA2;1*, *CYCB1;1* (que participan en la progresión de la transición G2/M) y *CYCD3;1* (que participa principalmente en G1/S, ver sección 1.4), además, se analizó la expresión de *KRP2* ya que es uno de los principales reguladores negativos de la actividad de las CDKs tanto en la transición G1/S como en G2/M (De Veylder *et al.*, 2001⁴⁸).

La expresión de estos cuatro genes se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa en las líneas de pérdida de función de *AGL17* en raíces de plántulas de 10 dps y en las raíces y vástagos aéreos de la línea de ganancia de función de *AGL17* inducible por β -estradiol. En este último caso, el tratamiento con estradiol se hizo únicamente a los 8 y 9 dps (es decir, suministrando una segunda aplicación a las 24 horas de la primera). El tejido de raíz y vástago aéreo se colectó por separado a los 10 dps.

CYCB1;1 presentó una expresión mayor en las líneas de pérdida de función (25 y 32 % más en las líneas *w-agl17* y *gk-agl17*, respectivamente; Figura 8A) y una expresión menor en la línea de ganancia de función tratada con β -estradiol (60 % menos; Figura 8B). La inhibición en la expresión de la *CYCB1;1* por la sobre-expresión de *AGL17* es específica para la raíz ya que los vástagos aéreos no presentaron variaciones en la expresión de esta ciclina (Figura 8B).

Por otra parte, no se observaron diferencias en la expresión de *CYCA2;1*, *CYCD3;1* y *KRP2* en las líneas de pérdida de función ni en las de ganancia de función (Figura 8).

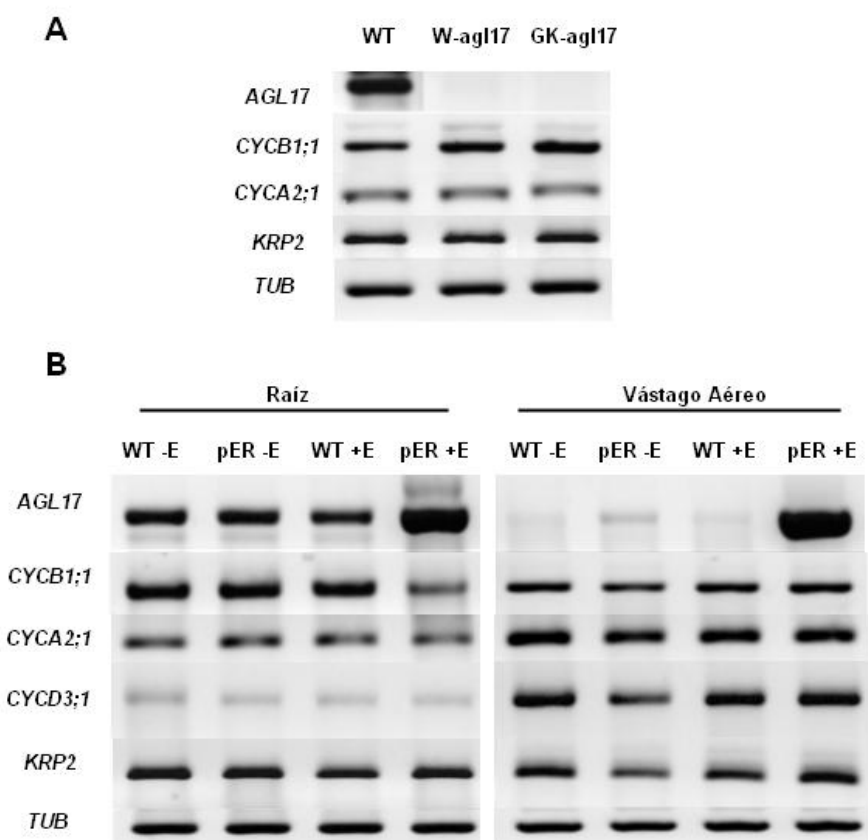


Figura 8. Análisis de la expresión genética de algunos componentes de la regulación del ciclo celular por RT-PCR semicuantitativa en tejido de raíz de 10 dps de las líneas de pérdida de función (A) y en raíz y vástago aéreo de las líneas de ganancia de función de *AGL17* a los 10 dps (B). En B, las plántulas fueron tratadas con β -estradiol (+E) o con DMSO como placebo (-E) a los 8 y 9 dps, y el tejido fue colectado a los 10 dps. pER (pER22-*AGL17*, la línea transgénica inducible por β -estradiol, ver Materiales y Métodos). Número de experimentos independientes = 3-4.

5.4 Análisis de Interacciones Genéticas entre *AGL17* y *AGL16*, *AGL21*, *SOC1* y *ANR1* en el Crecimiento de la Raíz Primaria.

Debido a que *AGL17*, *ANR1*, *AGL21* y *AGL16* presentan una alta similitud (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003⁹⁷) y a que *AGL17* interactúa con *AGL16*, *AGL21* y *SOC1* a nivel de proteína (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰), es posible pensar que algunos de estos genes podrían enmascarar el fenotipo de la pérdida de función de *AGL17*, por lo que se llevó a cabo la generación de los siguientes mutantes dobles entre las líneas de

pérdida de función de *AGL17* y líneas de pérdida de función de cada uno de los otros cuatro genes mencionados: *spm-agl21 gk-agl17*; *agl16 gk-agl17*; *anr1-2 gk-agl17*; *anr1-2 w-agl17* y *soc1 gk-agl17*. Una vez obtenidos se crecieron y se cuantificó la longitud de la raíz primaria a los 7 y 10 dps, la cual se comparó con las obtenidas en los mutantes sencillos y la línea de tipo silvestre.

Se observó que la pérdida de función simultánea de *AGL17* y cualquiera de los otros genes MADS-box estudiados tienen efectos diversos y dinámicos (Figura 9), por ejemplo, la pérdida de función de *AGL17* y *AGL21* no tiene efecto a los 7 dps (Figura 9A) pero a los 10 dps genera raíces más cortas que las de tipo silvestre (Figura 9B). Tampoco se observaron relaciones epistáticas claras, sin embargo, dentro de la diversidad de efectos puede observarse un patrón claro: la pérdida de función simultánea de *AGL17* y cualquier otro de los genes MADS-box que codifican a sus interactores proteicos (*AGL16*, *AGL21* y *SOC1*) genera raíces más cortas que las líneas parentales o la de tipo silvestre (Figura 9). Este efecto sólo fue estadísticamente significativo en una de las dos etapas del desarrollo analizadas en cada mutante doble: a los 7 dps para el mutante *agl16 gk-agl17* (Figura 9A) y a los 10 dps para los mutantes *spm-agl21 gk-agl17* y *soc1 gk-agl17*, sin embargo, también en las otras etapas la generación de raíces más cortas es notoria aunque no sea estadísticamente significativa (Figura 9). Este resultado es sorprendente, pues sugiere que al anular más de un miembro de los posibles dímeros o tetrámeros conformados junto con *AGL17* (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰), se observa un papel activador del crecimiento, contrario al efecto represor que se demostró anteriormente en el mutante sencillo de *AGL17* (este resultado se discute en la sección 6.4). Únicamente la pérdida de función simultánea de *AGL17* y *ANR1* no tuvo repercusión en la longitud de la raíz primaria (Figura 9B y datos no mostrados), por lo que podemos concluir que no existe redundancia funcional entre ellos, al menos en lo que concierne al crecimiento de la raíz primaria.

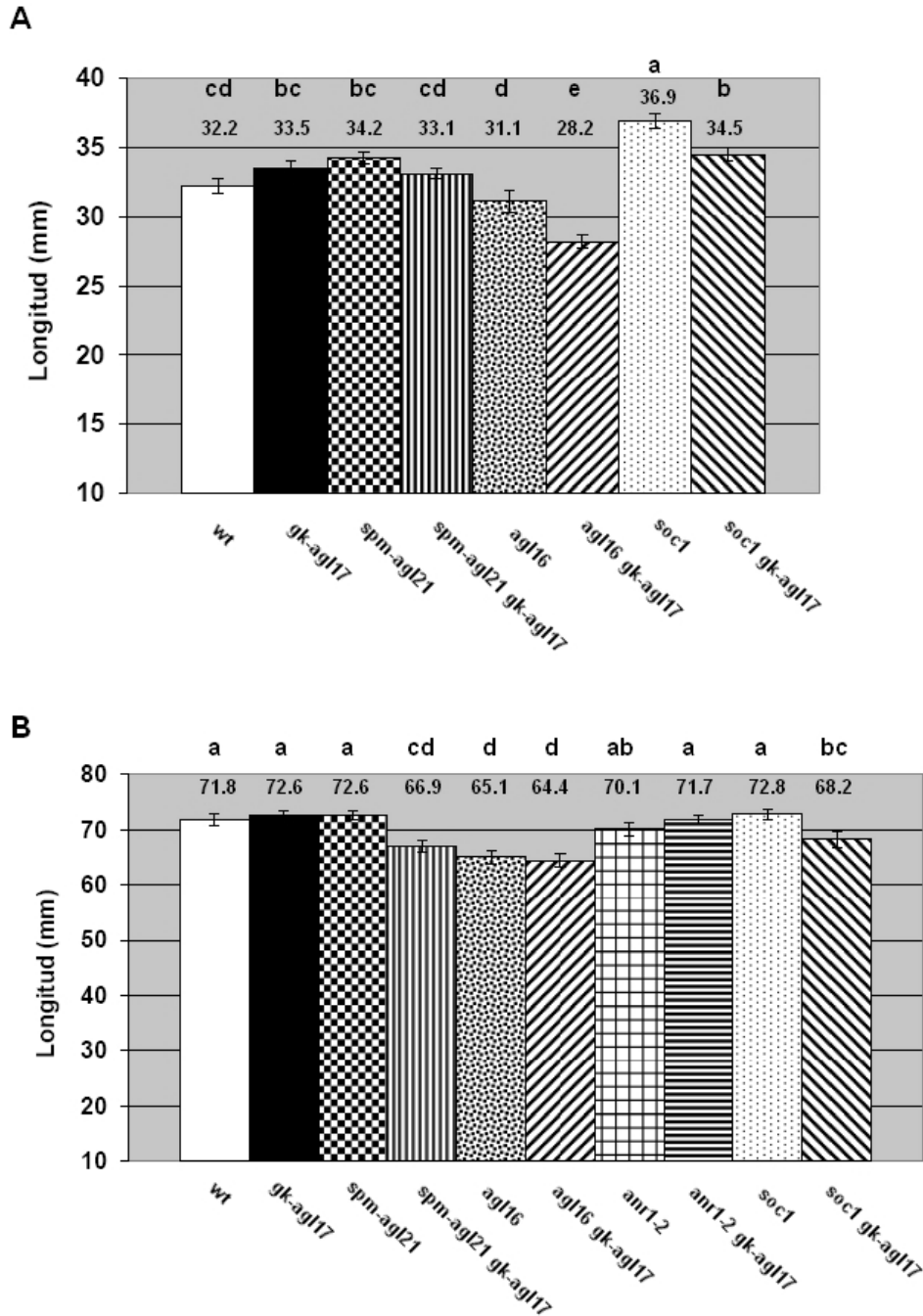


Figura 9. Comparación de las medias de longitud de la raíz primaria de los mutantes dobles, los mutantes simples y la línea de tipo silvestre a los 7 (A) y 10 dps (B). Las barras con letras distintas representan medias significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Mann-Whitney ($P < 0.05$). El tamaño de muestra (n) para cada línea a los 7 y 10 dps, respectivamente, es la siguiente: wt, $n = 64$ y 45 ; *gk-agl17*, $n = 65$ y 46 ; *spm-agl21*, $n = 60$ y 44 ; *spm-agl21 gk-agl17*, $n = 61$ y 46 ; *agl16*, $n = 23$ y 47 ; *agl16 gk-agl17*, $n = 35$ y 52 ; *anr1-2*, $n = 37$ (sólo en B); *anr1-2 gk-agl17*, $n = 50$ (sólo en B); *soc1*, $n = 60$ y 43 ; y *soc1 gk-agl17*, $n = 63$ y 40 . Las líneas en la parte superior de cada barra representan el error estándar y los valores numéricos (en mm) representan las medias. Número de experimentos = 1.

6. Discusión

6.1 *AGL17* es un Represor del Crecimiento de la Raíz

La función de los genes MADS-box expresados en la raíz ha sido pobremente estudiada si se compara con estudios de aquellos que participan en la transición a la floración y la organogénesis floral. Sin embargo, la caracterización de los que han sido estudiados demuestra que tienen funciones muy relevantes en el desarrollo de la raíz (Burgeff *et al.*, 2002¹⁰⁵; Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴).

En el presente trabajo se comenzó la caracterización de la función de *AGL17*, otro de los genes MADS-box cuya expresión es preponderante en la raíz (Burgeff *et al.*, 2002¹⁰⁵; Nawy *et al.*, 2005¹⁰⁶) al menos durante las etapas tempranas de su desarrollo post-embrionario (Figura 5). Ya con anterioridad se había observado que la pérdida de función de *AGL17* genera raíces más largas que las de genotipo silvestre cuando las plántulas son crecidas en condiciones nutricionales particulares (concentración de sales MS superior al 0.2X; Álvarez-Buylla, comunicación personal). Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias consistentes en el crecimiento de la raíz primaria entre las plántulas de las líneas de pérdida de función comparadas con la de tipo silvestre en condiciones nutricionales estándar (sales MS 0.2X, sacarosa al 1%, Figura 6).

Se han descrito algunos procesos en los que la raíz influye en el crecimiento y desarrollo de los órganos aéreos y viceversa (van Norman *et al.*, 2004¹¹⁶; Nelson, 2004¹¹⁷; Zhou *et al.*, 2008¹¹⁸), por lo que la ausencia de un fenotipo evidente en las plántulas podría deberse a que la pérdida de función de *AGL17* genera cambios en el crecimiento de la raíz muy sutiles que podrían ser enmascarados por algún tipo de señal compensatoria proveniente de la parte aérea. Para eliminar este efecto, se aislaron las raíces de los vástagos aéreos y en este contexto de desarrollo las raíces de las líneas de pérdida de función de *AGL17* resultaron ser significativamente más largas que las de tipo silvestre. De forma inversa, la línea de ganancia de función constitutiva (35S:*AGL17*) presentó raíces más cortas (Figura 6). Con estos experimentos se apoya el papel inhibitorio de *AGL17* en el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Para confirmar el fenotipo de la línea 35S:AGL17, se indujo la sobre-expresión de *AGL17* en una línea transgénica inducible por β -estradiol (pER22-AGL17), tanto en plántulas completas como en raíces aisladas, y en ambos casos se obtuvieron raíces más cortas que las de tipo silvestre (Figura 7). La discrepancia entre el fenotipo de tipo silvestre de la raíz en la línea 35S:AGL17 y el fenotipo de raíz corta en la línea inducible pER22-AGL17 observados en las plántulas completas puede deberse a que la construcción genética en la segunda promueve una sobre-expresión mucho mayor que las construcciones con promotores 35S tradicionales (Zou *et al.*, 2000¹¹⁴). Las diferencias encontradas son sutiles pero estadísticamente significativas y demuestran un papel represor de *AGL17* en el crecimiento de la raíz. Este efecto represor es débil y probablemente depende de la acción redundante de otros genes de la misma familia MADS-box.

Sin embargo, también hay que mencionar que debido a que se trata de una línea de sobre-expresión, el fenotipo observado podría ser producto de una ganancia de función de *AGL17* más que de la función desempeñada bajo los niveles de expresión de tipo silvestre.

Hasta ahora sólo se conocían genes MADS-box con un efecto promotor del crecimiento de la raíz (*XALI/AGL12*, Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴; *AGL14* y *AGL19*, Garay-Arroyo *et al.*, Jaimes-Miranda *et al.*, manuscritos en preparación), por lo que la caracterización del papel represor de *AGL17* sobre este proceso es novedosa y muy relevante para el entendimiento de la dinámica de regulación transcripcional que subyace tras la homeostasis del meristemo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Por otra parte, la expresión de *AGL17* en la raíz se incrementa de los 5 a los 10 dps (Figura 5), que es el mismo lapso de tiempo en el que se sabe que ocurre una aceleración del crecimiento de la raíz (Beemster and Baskin, 1998³). Dado el papel represor de *AGL17*, esta aceleración sólo podría ser posible si factores antagónicos a *AGL17* son activados durante este intervalo de tiempo conjuntamente con otra serie de cambios moleculares que modifiquen la dinámica de la proliferación celular en el meristemo y la dinámica del crecimiento y la diferenciación celular en la zona de transición, por ejemplo, a través del acoplamiento de un aumento en la tasa de proliferación celular en el meristemo (lo cual aumentaría el número de células por unidad de tiempo disponibles para el crecimiento) con un aumento simultáneo en la tasa de inicio de la diferenciación celular (lo cual aumenta el número de células que salen del meristemo por unidad de tiempo y que comienzan a

diferenciarse en los tejidos maduros de la raíz), todo esto sin modificar sustancialmente el tamaño del meristemo apical. Si esta sincronización entre proliferación y diferenciación tiene lugar, entonces *AGL17* podría participar en el módulo genético que regula los cambios en la dinámica celular del meristemo, actuando directamente sobre la regulación del ciclo celular y por lo tanto, en el proceso de proliferación celular. Para probar esta hipótesis, se cuantificaron los niveles de ARNm de algunos reguladores clave del ciclo celular en los fondos mutantes y en una de las líneas de sobre-expresión de *AGL17*.

6.2 Efecto de *AGL17* sobre algunos Componentes que Regulan la Progresión del Ciclo Celular en la Raíz

El efecto de *AGL17* en el crecimiento de la raíz puede llevarse a cabo a través de la regulación de la proliferación celular o del crecimiento anisométrico (alargamiento) de las células en proceso de diferenciación. Sin embargo, existe evidencia de que la tasa de proliferación regula directamente la tasa de alargamiento al determinar el número de células que se alargan por unidad de tiempo (Beemster and Baskin, 1998³). Por este motivo se decidió analizar el efecto de la pérdida y la ganancia de función de *AGL17* sobre algunos componentes del ciclo celular, el cual regula la tasa de proliferación celular en el meristemo apical de la raíz.

Algunas ciclinas de los tipos A, B y D se expresan abundantemente en el meristemo apical de la raíz (Engler Jde *et al.*, 2009¹¹⁹): en particular *CYCA2;1* (Burssens *et al.*, 2000⁸²), *CYCA3;1*, *CYCA3;2* (Takahashi *et al.*, 2010¹²⁰), *CYCB1;1*, *CYCB2;1* (Casimiro *et al.*, 2001¹²¹; Werner *et al.*, 2003¹²²) y *CYCD3;1* (Schmid *et al.*, 2005¹²³). Además, otros estudios correlacionan el nivel de la expresión de *CYCA2;1* (Burssens *et al.*, 2010¹²⁴), *CYCB1;1* (Doerner *et al.*, 1996¹²⁵; Lee *et al.*, 2003¹²⁶; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005¹²⁷), *CYCD2;1* (Qi y John, 2007¹²⁸), *CYCD3;1* y *CYCD3;2* (Zhang *et al.*, 2009¹²⁹) con la tasa de proliferación celular en el RAM y el crecimiento de la raíz. Así, en el presente trabajo se eligió una ciclina representativa de las clases A, B y D (*CYCA2;1*, *CYCB1;1* y *CYCD3;1*) para analizar su expresión en las líneas de pérdida y de ganancia de función de *AGL17*. También se analizó la expresión de *KRP2*, uno de los principales inhibidores de los

complejos CDK-ciclina, cuya expresión y función en el desarrollo de la raíz está bien documentada (De Veylder *et al.*, 2001⁴⁸; Himanen *et al.*, 2002⁵³).

La pérdida de función de *AGL17* genera un aumento en la expresión de *CYCB1;1* y su sobre-expresión tiene el efecto contrario (Figura 8) correlacionando claramente con los fenotipos observados en la raíz (Figuras 6 y 7). Además, es interesante que esta regulación sobre *CYCB1;1* es específica para este órgano ya que la sobre-expresión de *AGL17* en el vástago aéreo no repercutió en la expresión de esta ciclina (Figura 8B).

Por otro lado, la expresión de *CYCA2;1*, *CYCD3;1* y *KRP2* no se ve alterada en los fondos de pérdida y ganancia de función de *AGL17*, sugiriendo que este gen no es un regulador imprescindible de estos genes (Figura 8). Estos datos sugieren que *AGL17* tiene una función represora sobre la progresión del ciclo celular en la raíz durante la transición G2/M al inhibir la expresión de *CYCB1;1*, la principal ciclina mitótica. Sin embargo, los efectos de la pérdida y la ganancia de función de *AGL17* a nivel fenotípico no son tan evidentes debido a dos causas: una es que *AGL17* actúe redundantemente con otros factores represores y la otra es que existen factores activadores que compiten con *AGL17* y tienen mayor afinidad por los genes blanco que tienen en común. La segunda opción parece ser la más factible por dos razones: la primera es que no parece existir redundancia funcional de naturaleza represora entre *AGL17* y al menos los genes más cercanamente relacionados con él (ver secciones 5.4 y 6.4), la segunda es que la proteína *AGL17* se asocia con los mismos factores que *AGL12*, *AGL14* y *AGL19* (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰), los cuales son promotores del crecimiento de la raíz (Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴; Garay-Arroyo *et al.*, Jaimes-Miranda *et al.*, manuscritos en preparación), las implicaciones de este hecho se discuten en la siguiente sección.

En el presente trabajo se analizaron sólo algunos de los componentes del ciclo celular más representativos, pero un análisis más amplio que incluya un mayor número de componentes del ciclo celular (las CDKs, los factores MYB y otras ciclinas) podría permitir determinar si el papel de *AGL17* en este proceso es puntual o más preponderante de lo que este trabajo ha mostrado. Su acción puntual sugerida por los resultados de este trabajo podría constituir la explicación al papel sutil de este gene en el crecimiento de la raíz.

La regulación de la homeostasis del meristemo apical de la raíz ha mostrado ser un proceso muy robusto puesto que son pocas las alteraciones genéticas que ocasionan una

clara disrupción total de la actividad meristemática e incluso genes fundamentales del desarrollo de este órgano presentan dos o más homólogos que podrían actuar de manera redundante, por lo que sólo al generar la pérdida de función de todos ellos es posible observar alteraciones importantes e irreversibles en el meristemo (Galinha *et al.*, 2007¹⁹; Saiga *et al.*, 2008¹³⁰; Casson *et al.*, 2009¹³¹). Por ello, no es sorprendente que un factor de transcripción como AGL17 tenga una participación sutil en la actividad meristemática, ya que forma parte de una compleja red de regulación de la homeostasis del meristemo que lleva al crecimiento regulado y normal de este órgano, a través de los procesos coordinados de proliferación y diferenciación celular, en donde intervienen un gran número de factores tanto conocidos (ver secciones 1.3-1.5), así como de otros aún por determinar (Azpeitia *et al.*, 2010²²).

6.3 La Combinatoria de las Proteínas con Dominio MADS en los Complejos Funcionales Participa en la Regulación de la Homeostasis del Meristemo Apical de la Raíz

Como ya se ha mencionado, las proteínas con dominio MADS ejercen su función al asociarse entre sí en dímeros y tetrámeros (Davies *et al.*, 1996¹⁰⁷; Fan *et al.*, 1997¹⁰⁸; Kaufmann *et al.*, 2005¹⁰⁹). AGL17 y XAL1/AGL12 pueden dimerizar con AGL16, SOC1/AGL20 y AGL21 en ensayos de dos híbridos, mientras que AGL14 lo hace con AGL16 y SOC1 y AGL19 dimeriza con SOC1 y AGL21 (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰). Tanto AGL12, AGL14 y AGL19 son promotores del crecimiento de la raíz (Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴; Garay-Arroyo *et al.*, Jaimes-Miranda *et al.*, manuscritos en preparación) por lo que es posible que AGL17 deba competir con éstos por los interactores comunes para llevar a cabo su efecto represor sobre el crecimiento (Figura 10), y el que un solo represor deba competir con los tres activadores para formar los oligómeros funcionales puede desplazar el balance hacia la promoción del crecimiento. El hecho de que la expresión de *AGL17* se mantenga en niveles altos durante el desarrollo temprano de la raíz (Figura 5) y aun así se presenten aceleraciones en el crecimiento de este órgano (Beemster y Baskin, 1998³) y que su sobre-expresión sólo genere raíces ligeramente más cortas que las de tipo silvestre parecen indicar que: (1) la probabilidad de formar complejos “promotores del crecimiento”

es mayor , (2) la afinidad de AGL17 por sus interactores es baja, (3) el efecto represor de AGL17 es muy local (restringido a los tejidos donde se expresa: el CQ y la cofia lateral, Nawy *et al.*, 2005 ¹⁰⁶; Burgeff *et al.*, 2002 ¹⁰⁵) o (4) que el requerimiento de *AGL17* en la modulación del crecimiento de la raíz está enfocado a condiciones particulares de crecimiento, como a la presencia o ausencia de nutrientes o en respuesta a otro estímulo ambiental. En este mismo sentido, durante la sobre-expresión de *AGL17*, la concentración de su proteína podría superar a la de AGL12/14/19 en todos los tejidos de la plántula, lo cual posiblemente compensaría su baja afinidad por los factores comunes y sus restricciones espaciales, desplazando el equilibrio hacia la formación de tetrámeros represores, lo que sólo entonces permite evidenciar la función represora de este gene (Figuras 7, 8 y 10). Dicho esto, la función represora de *AGL17* parece limitarse a la modulación del crecimiento de la raíz que es promovido por los AGLs activadores, entre otros factores. Esta modulación podría generarse a través de la regulación de los AGLs comunes (AGL16, AGL21, SOC1), de tal manera que un aumento en la producción de éstos podría incrementar la probabilidad de que AGL17 tenga acceso a ellos y pueda ejercer su papel represor.

Se sabe que la expresión de *AGL16*, *AGL21* y *SOC1* se incrementa bajo condiciones de estrés por carencia de fosfatos (Gan *et al.*, 2005 ¹¹²), una condición que promueve un menor crecimiento de la raíz primaria (Linkhor *et al.*, 2002 ¹³²), en cambio, la expresión de *AGL17*, *AGL12*, *AGL14* y *AGL19* no es influenciada por la disponibilidad de nutrientes (Gan *et al.*, 2005 ¹¹²). En estas condiciones, el aumento en la concentración de AGL16, AGL21 y SOC1 resultantes, podrían promover que AGL17 tenga acceso a ellos y puedan modular el crecimiento de la raíz al reducir la proliferación celular (Figura 10). Claro está, este sería sólo una parte de los mecanismos que promueven la disminución del crecimiento de la raíz en estas condiciones. Por lo tanto, para poner a prueba esta hipótesis, sería interesante analizar detalladamente el crecimiento de las líneas de pérdida y de ganancia de función de *AGL17* en condiciones de deficiencia de fosfatos y nitratos, y alternativamente, observar el efecto que tiene la sobre-expresión conjunta de *AGL16*, *AGL21* y *SOC1* en el crecimiento de la raíz.

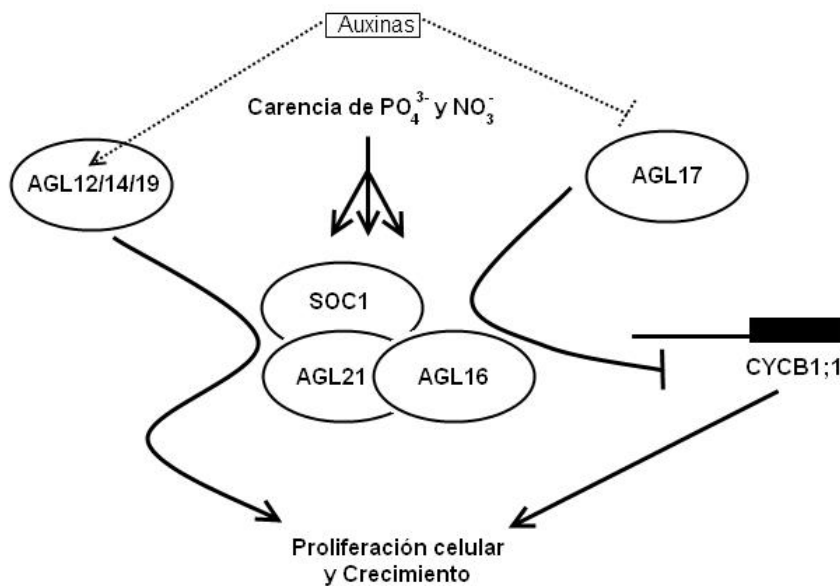


Figura 10. Modelo combinatorio de la función represora de AGL17 y las funciones activadoras de AGL12, AGL14 y AGL19 sobre el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana*. AGL17 compite con los tres activadores por la asociación con los tres factores comunes (AGL16, AGL21 y SOC1) para la formación de un tetrámero funcional que reprime la expresión de CYCB1;1, lo cual arresta el ciclo celular de las células meristemáticas en la transición G2/M inhibiendo el crecimiento de la raíz. Las auxinas promueven la expresión de AGL12 y podrían reprimir la de AGL17. Por otra parte, la carencia en fosfato y nitrato promueve la expresión de los interactores comunes, lo cual podría aumentar las posibilidades de que AGL17 forme parte del tetrámero represor.

Con respecto al vástago aéreo, la incapacidad de la sobre-expresión de AGL17 para repercutir en la expresión de CYCB1;1 (Figura 9) en las etapas tempranas del desarrollo de la plántula (10 dps) puede deberse a la ausencia de sus interactores (AGL16, AGL21 y SOC1) en estas etapas del desarrollo en tejidos aéreos, aunque la activación de su expresión en etapas posteriores podría modular el crecimiento y la producción de hojas del vástago aéreo al formar tetrámeros represores con AGL17 (ver Anexo 3 y sección 6.5). También es posible que AGL17 tenga un papel opuesto en el vástago aéreo del que tiene en la raíz: actuando exclusivamente como un factor activador, como sugiere la regulación positiva de LFY (LEAFY) y API (APETALA1) mediada por AGL17 (ver Anexos 1, 2 y sección 6.5).

Un aspecto final en el modelo es la integración con la señalización hormonal de las auxinas: estas hormonas promueven la proliferación celular a ciertas concentraciones (Himanen *et al.*, 2002⁵³; Sieberer *et al.*, 2003⁸¹) y una de las vías por la que llevan a cabo

este proceso podría estar mediado por *AGL12* (Tapia-López *et al.*, 2008⁹⁴). Por otra parte, la inhibición del transporte o de la señalización de las auxinas promueven la expresión de *AGL17* (<https://www.geneinvestigator.com>), por lo que el gradiente en la concentración de esta hormona que existe en el meristemo apical de la raíz, podría modular la acción de *AGL17* de forma tal que en la zona de transición de la raíz existiría un incremento en la expresión de *AGL17*, participando en la inhibición de la proliferación celular que ocurre al comienzo de la diferenciación de las células de la raíz.

6.4 *AGL17* y *ANR1* no actúan redundantemente y Existen Relaciones Genéticas Complejas entre *AGL17*, *AGL16*, *AGL21* y *SOC1* durante el Desarrollo de la Raíz

El fenotipo de las raíces de las líneas de pérdida y de ganancia de función de *AGL17* es el mismo que el de la línea de tipo silvestre en plántulas completas y los fenotipos de las raíces aisladas son sutiles (Figuras 6 y 7), por lo que es posible que la función de *AGL17* sea redundante o dependa de la presencia de proteínas codificadas por otros genes. Los genes candidatos más probables que podrían actuar redundantemente con *AGL17* son los genes MADS-box con mayor similitud en su secuencia nucleotídica con nuestro gene de estudio. Estos genes son *AGL21*, *AGL16* y *ANR1* (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003⁹⁷). Además, *AGL17* también podría requerir de la expresión de *AGL21*, *AGL16* y *SOC1* ya que interactúa físicamente con estos a nivel de proteína (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰).

Para llevar a cabo los análisis de interacciones genéticas se generaron cinco mutantes dobles: *spm-agl21 gk-agl17*; *agl16 gk-agl17*; *anr1-2 gk-agl17*; *anr1-2 w-agl17* y *soc1 gk-agl17* con la finalidad de analizar el efecto de la pérdida de función simultánea de *AGL17* con cada uno de los otros cuatro genes (sección 5.4).

La pérdida de función de cada uno de los genes analizados no genera alteraciones en la longitud de la raíz primaria en los mutantes sencillos de pérdida de función, con excepción del mutante *soc1*, cuya raíz primaria es más larga que la de tipo silvestre a los 7 dps (Figura 9A). Este resultado es preliminar y debe ser corroborado posteriormente. Sin embargo, estas observaciones sugieren que estos genes no son determinantes de manera individual para el crecimiento de la raíz, aunque la posibilidad de que presenten un fenotipo en raíces aisladas como ocurre con los mutantes *agl17* no puede ser descartado.

En el caso de los mutantes dobles, se observaron otros dos tipos de respuestas en el análisis del crecimiento de la raíz: por una parte, en *agl16 gk-agl17* la raíz primaria presentó una longitud menor que la de tipo silvestre y que las líneas mutantes parentales a los 7 dps, pero en etapas posteriores (10 dps) esta diferencia fue compensada (Figura 9). En el segundo tipo de respuesta, los mutantes dobles *spm-agl21 gk-agl17* y *soc1 gk-agl17* presentaron una longitud de tipo silvestre de la raíz primaria a los 7 dps pero en una etapa posterior (10 dps), la pérdida de función de estos dos genes generó raíces más cortas que las de tipo silvestre y que los mutantes parentales (Figura 9). Estas observaciones preliminares muestran una dinámica compleja en la regulación de la longitud de la raíz primaria por estos genes en donde los efectos de algunos de ellos muestran una dependencia temporal, es decir, algunos de ellos parecen tener contribuciones en etapas específicas del desarrollo de la raíz que pueden ser relevadas por otros genes en etapas posteriores, lo cual hace indispensable conocer con sumo detalle los patrones dinámicos de expresión de todos estos genes.

Es importante hacer notar que los dos tipos de respuestas mencionadas en el análisis del crecimiento de la raíz primaria de los dobles mutantes involucran una reducción en la longitud de la raíz únicamente cuando la pérdida de función de *AGL16*, *AGL21* o *SOC1* está acompañada de la pérdida de función de *AGL17* (Figura 9). Esta observación sugiere un papel activador de *AGL17*, *AGL16*, *AGL21* y *SOC1* durante el desarrollo de la raíz opuesto al papel represor de *AGL17* que ha sido mostrado hasta ahora.

Se han demostrado funciones tanto activadoras como represoras para algunas proteínas con dominio MADS en algunos procesos del desarrollo. Por ejemplo, el heterodímero SOC1-AGL24 tiene una función activadora directa sobre el gene *LFY* en las etapas más tempranas del desarrollo del meristemo de flor (Lee *et al.*, 2008¹³³). Sin embargo, el heterodímero SOC1-AGL24 también desempeña un papel represor tanto en el meristemo de inflorescencia como en los dos primeros estadios del meristemo de flor sobre *SEPALLATA3* (*SEP3*), lo que impide la activación temprana de los genes tipo B y C de la morfogénesis floral; esta función represora está mediada por SAP18, uno de los miembros del complejo Sin3-HDAC (desacetilasa de histonas) que modulan el silenciamiento epigenético mediante la acetilación de la histona H3 (Song y Galbraith, 2006¹³⁴; Liu *et al.*, 2009¹³⁵).

En el presente trabajo, se ha demostrado parcialmente que *AGL17* tiene una función principalmente represora en el crecimiento de la raíz, sin embargo, las proteínas con dominio MADS ejercen su función como dímeros o tetrámeros (Kaufmann *et al.*, 2005¹⁰⁹) y dado que no hay evidencia de que *AGL17* forme homodímeros, su actividad represora tendría que llevarse a cabo mediante la dimerización con *AGL16*, *AGL21* o *SOC1* (que son las proteínas con dominio MADS que se dimerizan con *AGL17* en ensayos de dos híbridos, de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰) u con otro tipo de proteínas. Sin embargo, el análisis de las interacciones genéticas entre *AGL17* y los genes que codifican a sus tres interactores sugiere que la función de los dímeros *AGL17-AGL16*, *AGL17-AGL21* y *AGL17-SOC1* es activadora al menos en algunas etapas del desarrollo, por lo que la función represora de *AGL17* tendría que estar mediada por otros factores desconocidos.

Por lo tanto, *AGL17* podría constituir un gene modulador del crecimiento de la raíz que puede actuar como represor o activador cuya función depende de los miembros con los que se asocia en los heterodímeros funcionales a distintas etapas del desarrollo. Parte de la sutileza de los fenotipos asociados a la ganancia y pérdida de función de este gene sobre el crecimiento de la raíz puede deberse a la doble función activadora/represora de *AGL17* que actuaría concertadamente con una plétora de factores que le brindan especificidad funcional.

Otra explicación para los fenotipos de raíz corta de los mutantes dobles *agl16 agl17*, *agl21 agl17* y *soc1 agl17* podría ser que la pérdida de función de los interactores comunes (*AGL16*, *AGL21* y *SOC1*) ocasione la disrupción parcial de la función activadora de *AGL12/14/19* sobre el crecimiento de la raíz. Sin embargo, esta explicación no es compatible con las observaciones de los fenotipos de los mutantes simples *agl16*, *agl21* y *soc1* los cuales presentan una longitud de la raíz que no difiere de la línea de tipo silvestre.

Por otra parte, puede generarse un modelo combinatorio que podría explicar la doble función de *AGL17* (Figura 11) tomando en cuenta, por un lado, la formación de tetrámeros funcionales entre las proteínas con dominio MADS y el papel activador de *AGL12/14/19*, y asumiendo por otro lado que: (1) *AGL17* puede formar parte de complejos promotores y represores del crecimiento con una mayor tendencia hacia la formación de estos últimos y (2) el papel represor lo lleva a cabo mediante su asociación con *AGL12/14/19* a través de AGLs comunes.

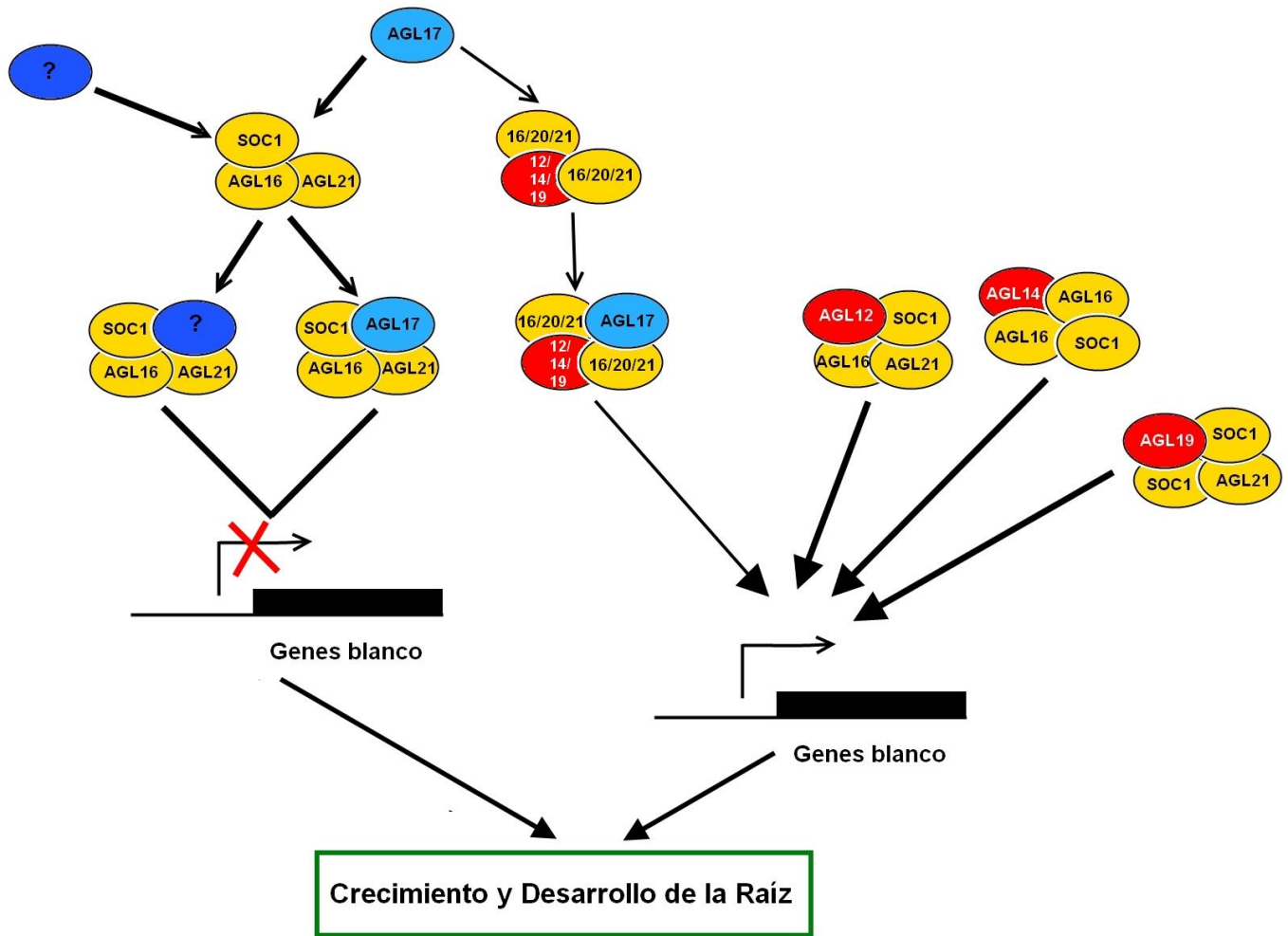


Figura 11. Modelo combinatorio parcial de la formación de tetrámeros activadores (derecha) y represores (izquierda) del crecimiento de la raíz entre proteínas con dominio MADS. AGL17 podría formar parte de ambos tipos de tetrámeros pero el balance tendría que estar desplazado hacia la formación de complejos represores (representado en el esquema por el grosor relativo de las flechas). La proteína denominada ? representa un factor hipotético que actúa redundantemente con AGL17.

De acuerdo a este modelo, si consideramos que un tetrámero con función promotora del crecimiento pudiera estar constituido *tanto* por un AGL activador (AGL12, por ejemplo) *como* por AGL17, así como por dos proteínas comunes (AGL16 y AGL21, por ejemplo), la pérdida de función simultánea de *AGL17* y *AGL21* en el mutante doble correspondiente tendría el efecto colateral de anular parcialmente la función promotora del crecimiento de *AGL12*, este efecto sería parcial porque AGL12 aún podría formar otros

tetrámeros funcionales con otras de las proteínas disponibles como AGL16 y SOC1. Por otro lado, el papel represor del crecimiento de *AGL17* estaría determinado por la formación de tetrámeros donde sólo ocurra la hetero-oligomerización de AGL17 con los interactores comunes (AGL16, AGL21 y SOC1; Figura 11).

Este modelo permite explicar todos los fenotipos observados en el presente trabajo: (1) las raíces del mutante simple de *AGL17* son ligeramente más largas que las del tipo silvestre ya que este gene también forma parte de los tetrámeros promotores del crecimiento junto con AGL12/14/19, pero debido a que el balance estaría ligeramente desplazado hacia la formación de tetrámeros represores, el efecto fenotípico que se observa sería precisamente el de esta última función (Figuras 6B y 11). (2) En la línea de ganancia de función de *AGL17* tenderían a formarse tetrámeros promotores e inhibidores del crecimiento, pero el balance estaría desplazado hacia la formación de estos últimos, generando raíces ligeramente más cortas que las del tipo silvestre (Figuras 7 y 11). (3) La pérdida de función simultánea de *AGL17* y cualquiera de los genes que codifican para los interactores comunes en los mutantes dobles analizados generan raíces más cortas que las de tipo silvestre ya que en estos casos se estaría impidiendo la formación de algunos de los posibles tetrámeros promotores del crecimiento (en los que AGL12, AGL14 o AGL19 serían componentes indispensables), lo cual sería evidenciado a nivel fenotípico (Figuras 9 y 11).

Finalmente, debe hacerse notar que *AGL17* y sus interactores son sólo un pequeño módulo genético de una compleja red de regulación que determina la homeostasis del meristemo y el crecimiento de la raíz, por lo que lo descrito en esta tesis brindará un mayor entendimiento de este proceso en la medida en la que pueda ser integrado a un marco conceptual más amplio.

6.5 AGL17 es un Protomor de la Transición a la Fase Reproductiva (Floración) y Regula el Desarrollo Vegetativo en el Vástago Aéreo Junto con AGL21

La transición a la floración es de importancia fundamental en el ciclo de vida de cualquier angiosperma ya que es el punto de inicio de la producción de la siguiente

generación por lo que determina la adecuación del organismo. Este proceso puede llevarse a cabo en *Arabidopsis thaliana* a través de cuatro vías principales interconectadas de acuerdo a la caracterización de los fenotipos de los genes mutados. Estas vías son: la del fotoperiodo, la de vernalización, la autónoma y la regulada por las giberelinas (Amasino, 2010¹³⁶).

Como se describe detalladamente en los Anexos 1 y 2, *AGL17* tiene un papel promotor de la floración a través de la vía del fotoperiodo. En el fotoperiodo inductor de días largos, la estabilización de la proteína CO (CONSTANS) al final de la etapa de luz promueve la expresión de *AGL17* en el vástago aéreo y éste es capaz de inducir la expresión de los genes de identidad del meristemo floral *LFY* y *API* paralelamente a la acción de *FT* (*FLOWERING LOCUS T*). La existencia de estas dos vías (la de *FT* y la de *AGL17*) garantiza la robustez de la respuesta de la floración ante el fotoperiodo asegurando que esta etapa crítica en el ciclo de vida de *A. thaliana* pueda llevarse a cabo.

AGL21 es el gene con mayor similitud a *AGL17* (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003⁹⁷), por lo que existe la posibilidad de que sus funciones en la transición a la floración sean similares. De hecho, la pérdida de función de *AGL21* genera un retraso en la floración muy similar al que ocurre por la pérdida de función de *AGL17* (Anexo 3). Este retraso en la línea mutante *w-agl21* se evidencia únicamente por la mayor producción de hojas de la roseta previamente a la floración bajo un fotoperiodo de días largos, en comparación a las plantas de tipo silvestre. Por otro lado, la pérdida de función simultánea de *AGL21* y *AGL17* en el mutante doble no acentúa el retraso de la floración que presentan los mutantes individuales parentales (Anexo 3), por lo tanto, estos dos genes podrían actuar conjuntamente en la inducción de la floración posiblemente formando parte de un mismo heterodímero (de Folter *et al.*, 2005¹¹⁰).

Dado que las pérdidas de función de *AGL21* y de *AGL17* (en el caso del alelo *gk-agl17*) no retrasan la floración temporalmente, sino sólo ontogenéticamente (Anexo 3), es adecuado desligar los procesos de la transición a la floración y el desarrollo vegetativo considerándolos hasta cierto punto independientes uno del otro. Bajo este esquema tanto *AGL17* como *AGL21* participarían en la inhibición del desarrollo vegetativo y *AGL17* también en la promoción de la floración. Este papel represor de estos genes en el desarrollo vegetativo del vástago aéreo estaría en concordancia con el papel represor de *AGL17* en el

crecimiento de la raíz, por lo que podría llegar a considerarse que este gene tiene dos funciones principales: por un lado sería un represor general del crecimiento y por otro, un promotor de la floración.

7. Conclusiones

1. La expresión de *AGL17* puede detectarse en la raíz a los 5 dps y a los 10 dps presenta un incremento que se mantiene en etapas posteriores.
2. *AGL17* es un represor del crecimiento de la raíz dado que la pérdida y la ganancia de función de este gene generan un mayor y un menor crecimiento de este órgano, respectivamente, que las plantas de tipo silvestre.
3. *AGL17* regula negativamente la expresión de la *Ciclina B1;1* exclusivamente en la raíz.
4. La raíz de los mutantes dobles de *agl17* con *agl16*, *agl21*, *soc1* o *anr1* crece menos o igual que la de los mutantes parentales, lo que refleja una compleja red de regulación del crecimiento de este órgano que posiblemente subyazca en la combinatoria de los complejos formados por las proteínas con dominio MADS.
5. *AGL17* es un promotor de la floración de la vía del fotoperiodo y *AGL21* podría participar en la misma vía.

8. Anexo 1

La transición a la floración: marco teórico y principales resultados del artículo: “*AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a *FT*-independent photoperiod pathway” (*AGAMOUS-LIKE 17*, un nuevo promotor de la floración, actúa en la vía del fotoperiodo independientemente de *FT*).

Introducción

El ciclo de vida de muchas plantas está sincronizado con los cambios estacionales a lo largo del año y esta respuesta es particularmente importante en latitudes altas donde se presentan cambios radicales en las condiciones ambientales entre las diferentes estaciones. Uno de los cambios principales a lo largo del año es la duración del día o fotoperiodo. La percepción de los cambios en la duración del día es uno de los mecanismos principales que presentan las plantas para detectar los cambios estacionales (Turck *et al.*, 2008¹³⁷).

Arabidopsis thaliana es una planta de floración facultativa en días largos que florece más tempranamente en un fotoperiodo de 16 hrs de luz y 8 de oscuridad que en un fotoperiodo de días cortos de 8 hrs de luz y 16 de oscuridad (Turck *et al.*, 2008¹³⁷). Se han propuesto varios modelos para explicar el efecto del fotoperiodo en la floración desde que se describió este fenómeno a principios del siglo XX, pero el que ha sido mejor respaldado por la evidencia experimental es el modelo de la “coincidencia externa”, el cual postula que la transición a la floración se lleva a cabo cuando una señal producida por un ritmo interno (el reloj biológico circadiano, RBC) coincide con una señal externa (la luz, Lagercrantz, 2009¹³⁸). En la versión molecular actual del modelo de la coincidencia externa, el gene *CONSTANS* (*CO*) y la proteína que codifica es el componente clave en la percepción del fotoperiodo en *A. thaliana* (Putterill *et al.*, 1995¹³⁹).

La expresión de *CONSTANS* es regulada por el RBC, el cual consiste en una compleja red de factores transcripcionales que se regulan mutuamente tanto a nivel transcripcional como pos-traducciona l y cuyos componentes individuales alcanzan picos máximos de expresión en distintos momentos del ciclo día-noche (Imaizumi, 2010¹⁴⁰). La actividad del RBC se sincroniza con el ciclo circadiano externo de luz y oscuridad a través de la acción de los fotorreceptores de luz roja (fitocromos) y de luz azul (criptocromos,

Devlin y Kay, 2000¹⁴¹). El RBC regula parcialmente la expresión de *CO* al promover la degradación de los represores transcripcionales de este gene en un momento específico del día: CDF1 (CYCLING DOF FACTOR 1) es uno de estos represores e inhibe la transcripción de *CO* en la mañana (Fornara *et al.*, 2009¹⁴²), pero después del medio día, la expresión de *CDF1* es fuertemente inhibida por PRR5, PRR7 y PRR9 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5/7/9), los cuales son componentes del RBC (Nakamichi *et al.*, 2007¹⁴³); y al mismo tiempo, la proteína CDF1 es ubiquitinada para su degradación por el complejo GI/FKF1 (GIGANTEA/FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1) cuyos miembros también son componentes del RBC y sus respectivos genes comienzan a expresarse después del medio día (Sawa *et al.*, 2007¹⁴⁴). Esto tiene como resultado el incremento en la abundancia del ARNm de *CO* al atardecer de los fotoperiodos de días largos. En la noche, GI es degradada por la acción de COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1) que es una ubiquitin-ligasa E3 (Yu *et al.*, 2008¹⁴⁵), lo cual cierra el ciclo de la regulación circadiana de *CO* y lo prepara para su reinicio al amanecer del día siguiente. Lo descrito anteriormente ocurre tanto en el fotoperiodo de días largos como en el de días cortos, pero en los días cortos la acumulación del ARNm de *CO* comienza al anochecer y su pico máximo también es por la noche (Suárez-López *et al.*, 2001¹⁴⁶), lo cual constituye una diferencia crítica en la respuesta de la floración ante estos dos tipos de fotoperiodo en *A. thaliana* cuyas consecuencias se describen a continuación.

Una vez que *CO* se ha expresado después del medio día en el fotoperiodo de días largos, la proteína CO es estabilizada por la señalización del fitocromo A y los criptocromos (Valverde *et al.*, 2004¹⁴⁷) y esta estabilización de CO promueve la transcripción de *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) en el tejido vascular de las hojas, uno de los genes cuyo producto proteico se requiere en el meristemo apical del vástago aéreo para promover la floración a través de la vía del fotoperiodo (Samach *et al.*, 2000¹⁴⁸; An *et al.*, 2004¹⁴⁹; Corbesier *et al.*, 2007¹⁵⁰). Y es aquí donde el modelo de la coincidencia externa mantiene su vigencia: es la presencia de la señal interna generada por el RBC (el pico máximo en la expresión de *CO* al atardecer de los días largos) que coincide con la señal externa (la luz) lo que promueve la floración de las plantas inducidas por el fotoperiodo de días largos (Figura 12). En cambio, en el fotoperiodo de días cortos el pico máximo en la expresión de *CO* no coincide con el periodo de luz (Suárez-López *et al.*, 2001¹⁴⁶) lo cual

impide la estabilización de la proteína CO y la inducción de la transcripción de *FT*, por lo que no se lleva a cabo la transición a la floración (Lagercrantz, 2009¹³⁸).

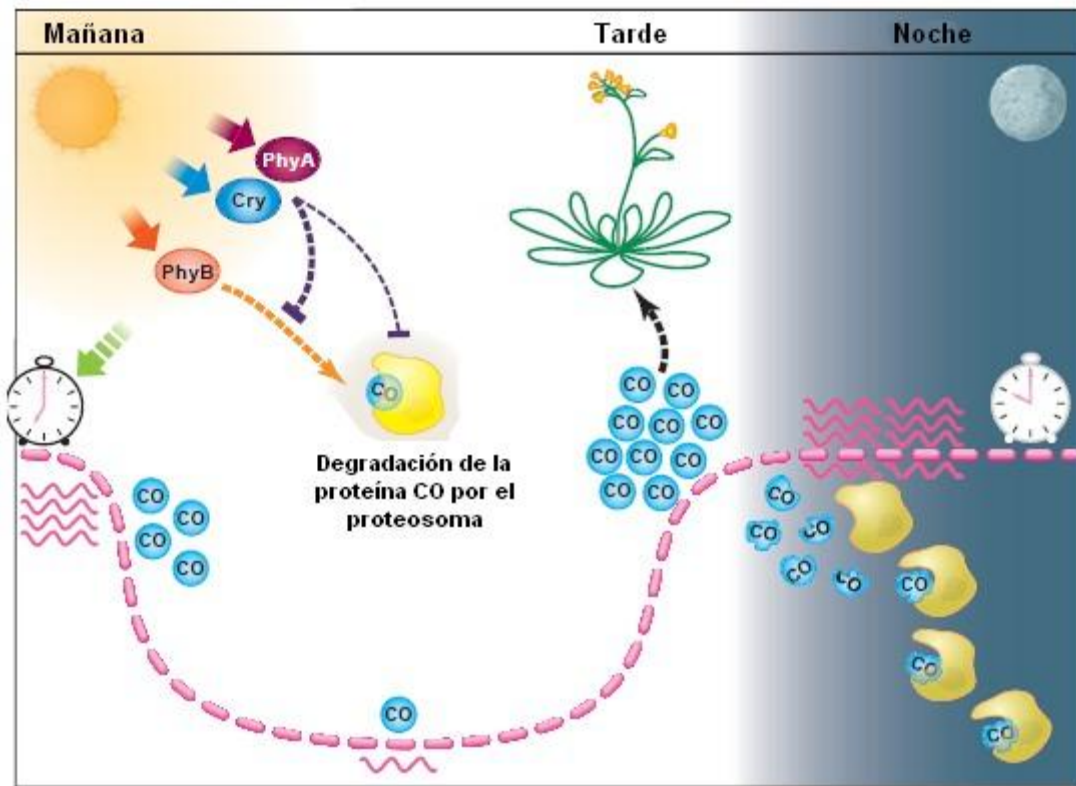


Figura 12. Inducción de la transición a la floración en *Arabidopsis* por el fotoperiodo de días largos. La acumulación del ARNm de *CO* (línea lila punteada) es regulada por la acción del RBC que inhibe la expresión de *CO* en la mañana a través de la acción de CDF1 y por otra parte, la proteína CO es degradada durante la mañana por la señalización del fitocromo B (PhyB). Al pasar el medio día, la acción de los PRRs por una parte y del complejo GI/FKF1 por otra, liberan a CO de la represión transcripcional de CDF1 y permiten la acumulación del ARNm de CO hasta alcanzar un nivel máximo justo antes del atardecer, éste se traduce y la proteína CO (esferas azules) es estabilizada también antes del anochecer por la acción de fitocromo A (PhyA) y de los criptocromos (Cry). La acumulación de la proteína CO antes del anochecer promueve la transcripción de *FT*, cuya proteína será transportada a través del floema hacia el meristemo apical del vástago aéreo donde iniciará su conversión a un meristemo de inflorescencia. Por la noche, la proteína CO es degradada por SPA1 y el ciclo comienza de nuevo al amanecer del día siguiente. La flecha verde representa la sincronización del RBC por los fotorreceptores al inicio del día (La figura fue tomada y modificada de Klejnot y Lin, 2004¹⁵¹).

Finalmente, en el periodo de oscuridad de los días largos, la proteína CO ya no es estabilizada por los fotorreceptores y su degradación es promovida por el complejo SPA1

(SUPPRESSOR OF PHYA-1)/COP1 (Figura 12, Laubinger *et al.*, 2006¹⁵²; Jang *et al.*, 2008¹⁵³).

Una vez que CO ha promovido la expresión de *FT* en el tejido vascular de las hojas durante el fotoperiodo de días largos (Wigge *et al.*, 2005¹⁵⁴), el ARNm de *FT* es traducido a proteína y ésta es translocada al SAM a través del floema (Corbesier *et al.*, 2007¹⁵⁰; Mathieu *et al.*, 2007¹⁵⁵). Una vez en el SAM, FT se dimeriza con FD (FLOWERING LOCUS D), un factor de transcripción tipo bZIP (Abe *et al.*, 2005¹⁵⁶), y activa algunos genes de la familia MADS-box como *SOC1*, *API* (*APETALA1*) y *FUL* (*FRUITFUL*, Yoo *et al.*, 2005¹⁵⁷; Abe *et al.*, 2005¹⁵⁶; Teper-Bamnolker y Samach, 2005¹⁵⁸). *SOC1* es un integrador de la inducción de la floración que regula la expresión de *LFY* (*LEAFY*), uniéndose a su promotor en un complejo junto con *AGL24* (Lee *et al.*, 2008¹³³). *LFY* y *API* son genes que dirigen a ciertos grupos de células en los flancos del SAM para diferenciarse en meristemos florales (Ruiz-García *et al.*, 1997¹⁵⁹; Amasino, 2010¹³⁶).

De esta forma, el fotoperiodo de días largos promueve la inducción de los genes (*SOC1*, *LFY*, *API* y *FUL*, entre otros) que dirigen la diferenciación de los meristemos de inflorescencia a florales por la intermediación de CO y FT. La transición a la floración en *A. thaliana* es un proceso irreversible una vez que ha comenzado y esto puede deberse en gran medida a la retroalimentación que existe entre los genes expresados en el SAM de manera que su transcripción es activada mutuamente (Amasino, 2010¹³⁶), tal como ocurre con *LFY* y *API* (Liljegren *et al.*, 1999¹⁶⁰) o con *SOC1* y *AGL24* (Liu *et al.*, 2008¹⁶¹).

En el artículo publicado durante la realización del presente trabajo se determinó que *AGL17* tiene un papel promotor en la transición a la floración actuando a través de una vía paralela a la de *FT*, ya que su expresión depende de *CO* en el fotoperiodo de días largos y es capaz de promover la expresión de los genes florales *LFY* y *API* independientemente de la acción de *FT*.

Resumen de los resultados

1. *La expresión de AGL17 aumenta en el vástago aéreo durante la transición a la floración: AGL17 se expresa en la parte aérea de la planta y la abundancia de su ARNm*

aumenta en el fotoperiodo de días largos en días previos a la floración y se mantiene en un nivel alto en etapas posteriores (Anexo 2, Figura 1).

2. *AGL17 promueve la transición a la floración a través de la vía del fotoperiodo*: la pérdida de función de *AGL17* retarda la floración únicamente en regímenes de días largos y la ganancia de función la acelera tanto en el fotoperiodo de días largos como en el de días cortos, pero especialmente en el primero (Anexo 2, Figura 2 y 7b).
3. *CO es un regulador positivo de AGL17*: la acumulación del ARNm de *AGL17* se encuentra reducida específicamente en las líneas de pérdida de función de *CO* (Anexo 2, Figuras 3 y 5c) y de manera inversa, hay mayor acumulación en las líneas de ganancia de función de *GI* y *CO* (Anexo 2, Figura 4a). Además, el efecto de la luz sobre la estabilización de la proteína *CO* al finalizar el periodo de luz en el fotoperiodo de días largos también promueve la acumulación del ARNm de *AGL17*, de forma similar a lo que ocurre con el de *FT* (Anexo 2, Figura 4b). Finalmente, la sobre-expresión de *AGL17* puede revertir parcialmente la floración tardía de las líneas de pérdida de función de *CO* e, inversamente, la pérdida de función de *AGL17* puede revertir parcialmente la floración temprana de las líneas de sobre-expresión de *CO* (Anexo 2, Figura 4c). Todas estas evidencias permiten establecer a *CO* como un inductor de la transcripción de *AGL17*.
4. *AGL17 actúa paralelamente a FT en la inducción de la floración*: la acumulación del ARNm de *AGL17* no se ve afectado por la pérdida de función de *FT* y viceversa (Anexo 2, Figuras 3c y 6a). Además, la pérdida de función de ambos genes tiene un efecto sumatorio sobre el retraso de la floración (Anexo 2, Figura 4c).
5. *AGL17 regula positivamente la transcripción de API y LFY*: la acumulación del ARNm de los genes del meristemo floral *API* y *LFY* se encuentra disminuido en las líneas de pérdida de función e incrementado en la línea de ganancia de función de *AGL17* (Anexo 2, Figuras 6 y 7c).

Estas observaciones permiten situar a *AGL17* como un componente que promueve la floración a partir de una vía del fotoperiodo alterna a la de *FT* pero iniciada igualmente por *CO*, el cual promueve la expresión de *AGL17* que a su vez induce la expresión de los genes de identidad del meristemo floral *API* y *LFY*.

Este hallazgo es importante ya que ha permitido identificar a *AGL17* como un componente que brinda robustez y flexibilidad a la respuesta de floración ante el fotoperiodo inductivo (el de los días largos), asegurando la transición al estado reproductivo.

9. Anexo 2

Han P, García-Ponce B, **Fonseca-Salazar G**, Álvarez-Buylla ER and Yu H. (2008). *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a *FT*-independent photoperiod pathway. *The Plant Journal* **55**: 253-265.

AGAMOUS-LIKE 17, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway

Ping Han¹, Berenice García-Ponce², Gabriel Fonseca-Salazar², Elena R. Alvarez-Buylla² and Hao Yu^{1,2,*}

¹Plant Functional Genomics Laboratory, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, National University of Singapore, 14 Science Drive 4, 117543, Singapore,

²Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas, Dpto de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er Circuito Exterior S/N Junto a Jardín Botánico, México D.F. 04510, Mexico, and

³Plant Functional Genomics Group, Temasek Life Sciences Laboratory, 1 Research Link, National University of Singapore, 117604, Singapore

Received 26 January 2008; revised 7 March 2008; accepted 12 March 2008; published online 19 May 2008.

*For correspondence (fax +65 67792486; e-mail dbyuhao@nus.edu.sg).

Summary

The photoperiod pathway is a genetically conserved pathway that affects flowering in distantly related angiosperms. Here we report a novel flowering promoter *AGAMOUS-LIKE 17* (*AGL17*) acting in the photoperiod pathway of *Arabidopsis*. *AGL17* transcripts were detectable in various plant organs with the highest expression in the root. Under long-day conditions, expression of *AGL17* gradually increased in the aerial part of seedlings during the floral transition. Overexpression of *AGL17* caused early flowering, while loss of function of *AGL17* exhibited late flowering, particularly under long days. Analysis of *AGL17* expression in various flowering-time mutants showed that its transcripts were significantly reduced in the photoperiod pathway mutant *co-1*. Correspondingly, *AGL17* expression was upregulated in transgenic plants overexpressing *CONSTANS* (*CO*) and also when *CO* activity was induced by light. Genetic analysis further showed that overexpression of *AGL17* could partially suppress the late flowering of *co-1*. These results suggest that *AGL17* acts to promote flowering and is positively controlled by the photoperiod pathway regulator *CO*. In contrast, another target of *CO*, *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), did not affect *AGL17* expression, and vice versa. The expression of two floral meristem identity genes *LEAFY* (*LFY*) and *APETALA1* (*AP1*) decreased in *agl17-1*, while *LFY* and *AP1* could be rapidly induced by *AGL17* using a functional estradiol-inducible system. These findings indicate that *AGL17* ultimately promotes flowering via regulation of *LFY* and *AP1*.

Keywords: *AGAMOUS-LIKE 17*, flowering time, *CONSTANS*, photoperiod, MADS-box gene, *Arabidopsis*.

Introduction

In plants, the achievement of reproductive success is highly dependent on flowering at the right time. The timing of flower initiation is a highly plastic developmental process that requires the continuous perception and processing of a myriad of environmental and internal signals (Ausin *et al.*, 2005; Bäurle and Dean, 2006; Putterill *et al.*, 2004). Molecular genetic dissection of the control of flowering time in *Arabidopsis* has identified an integrated network of at least four pathways that quantitatively control the timing of this developmental switch (Boss *et al.*, 2004; Levy and Dean, 1998; Mouradov *et al.*, 2002; Simpson and Dean, 2002). These pathways not only mediate signals from the environment but also monitor the endogenous developmental state of the

plant, thereby encompassing physical, chemical as well as biological cues for the initiation of flowering. These distinct pathways ultimately converge to regulate the expression of common downstream target genes, usually called floral pathway integrators, which include *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), *LEAFY* (*LFY*) and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS* (*SOC1*), which is also known as *AGAMOUS-LIKE 20* (*AGL20*) (Boss *et al.*, 2004; Mouradov *et al.*, 2002; Simpson and Dean, 2002). These genes integrate inputs originating from the different flowering cascades and convey the resulting signal to floral meristem identity genes at the shoot apex, thereby promoting a vegetative-to-reproductive fate change and initiating floral transition.

CONSTANS (*CO*), which plays a key role in the photoperiod pathway, has been shown to trigger flowering by regulating three floral pathway integrators. In *co* mutants, the expression of *LFY*, *FT* or *SOC1* is reduced (Kobayashi *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Nilsson *et al.*, 1998), while induced *CO* activity can upregulate the expression of these three genes (Samach *et al.*, 2000). Apart from being promoted by day length, *LFY* expression is also upregulated by gibberellin (GA) (Blázquez *et al.*, 1998). Deletion of a *cis*-element within the *LFY* promoter abolishes its response to GA but does not affect the induction of *LFY* by photoperiod (Blázquez and Weigel, 2000). Thus, the GA and photoperiod pathways appear to converge on the *LFY* promoter. Gibberellin is also involved in inducing the expression of another floral pathway integrator, *SOC1* (Moon *et al.*, 2003). In addition, *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), which is at the convergence point of the autonomous and vernalization pathways, acts to repress flowering by suppressing the expression of *SOC1* in the shoot meristem (Michaels and Amasino, 1999; Searle *et al.*, 2006). It has been shown that *CO* is recruited directly to the *SOC1* promoter by a DNA-binding factor to activate *SOC1* under long days, while *FLC* binds to a separate *cis*-element on the *SOC1* DNA via a CArG motif to mediate signals from the autonomous and vernalization pathways (Hepworth *et al.*, 2002). Therefore, *SOC1* appears to be a common target for all flowering pathways, coordinating responses to several environmental and endogenous signals (Lee *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2003). Another floral pathway integrator, *FT*, encodes a protein that acts as a long-distance floral signal moving from the leaf to the meristem and is regulated by several pathways as mutations that impair the function of the photoperiod, autonomous and vernalization pathways reduce the expression of *FT* (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Mathieu *et al.*, 2007). Overexpression of *CO* activates *FT* expression, while *FLC* represses *FT* (Samach *et al.*, 2000; Searle *et al.*, 2006). In addition, *FT* also mediates thermal induction of flowering by elevated growth temperature (Balasubramanian *et al.*, 2006). The floral pathway integrators appear to be linked to one another and have the ability to potentiate each other's activity, thus forming an intricate gene regulatory network. The intricacy of the flowering network is further complicated by crosstalk between various flowering pathways, thus resulting in the integration of linear cascades into increasing complex pathways and posing a great challenge for the elucidation of the molecular control of floral transition.

In plants, members of the MADS-box family of transcription factors are involved in many aspects of plant development such as floral meristem and organ identity determination and flower initiation as well as silique development (Ng and Yanofsky, 2001; Riechmann and Meyerowitz, 1997). While an increasing number of MADS-box family genes in *Arabidopsis* have shown either promotive or

repressive function in the control of flowering time, they seem to act at distinct genetic loci in the regulatory hierarchy of flowering networks (Adamczyk *et al.*, 2007; Borner *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Michaels and Amasino, 1999; Ratcliffe *et al.*, 2001, 2003; Schönrock *et al.*, 2006; Scortecci *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002). In this study, we report that *AGL17*, a MADS-box gene, which was previously reported to be expressed mainly in roots, functions in the promotion of flowering in *Arabidopsis* (Rounsley *et al.*, 1995). *AGL17* acts downstream of *CO* and upstream of the floral meristem identity genes *LFY* and *APETALA1* (*AP1*).

Results

Spatial and temporal expression of AGL17

To examine the tissue expression pattern of *AGL17* in *Arabidopsis*, RT-PCR analysis was carried out with total RNA extracted from various tissues. Although *AGL17* was highly expressed in the roots as previously reported (Burgeff *et al.*, 2002), transcripts were also detectable in the floral bud, mature flower, leaf and stem (Figure 1a). Expression of *AGL17* was low in the inflorescence meristem and the vegetative shoot apex that may contain emerging leaf primordia and residual petioles, but absent in the siliques. Detailed examination of the expression of *AGL17* in the shoot apex by *in situ* hybridization did not reveal significant signals due to its low expression levels. The expression of *AGL17* in the shoot apex, as well as in reproductive tissues such as the inflorescence meristem and flowers, suggests a possible involvement of *AGL17* in the flowering process.

Temporal changes in *AGL17* transcript levels were further determined by RT-PCR to investigate whether *AGL17* expression was regulated during the flowering process. Under our long-day (LD) conditions, floral transition in Columbia wild-type plants occurred around 11 days after germination, as indicated by significant upregulation of *AP1* expression (data not shown). *AGL17* expression was gradually upregulated in the aerial part of seedlings from 7 days after germination and plateaued around day 15 under LDs (Figure 1b). The expression of *AGL17*, however, remained almost unchanged in the plants grown under short-day (SD) conditions (Figure 1c). The temporal expression trend of *AGL17* was comparable with that exhibited by another flowering promoter *SOC1* (Figure 1b and c), suggesting that upregulation of *AGL17* may also be relevant to floral transition.

agl17 mutants exhibit delay in flowering time

To investigate the function of *AGL17* in plant development, we identified two insertional mutants, *agl17-1* and *agl17-2* (Figure 2a). *agl17-1* contained a T-DNA insertion at the fifth intron of the *AGL17* genomic sequence, while *agl17-2*

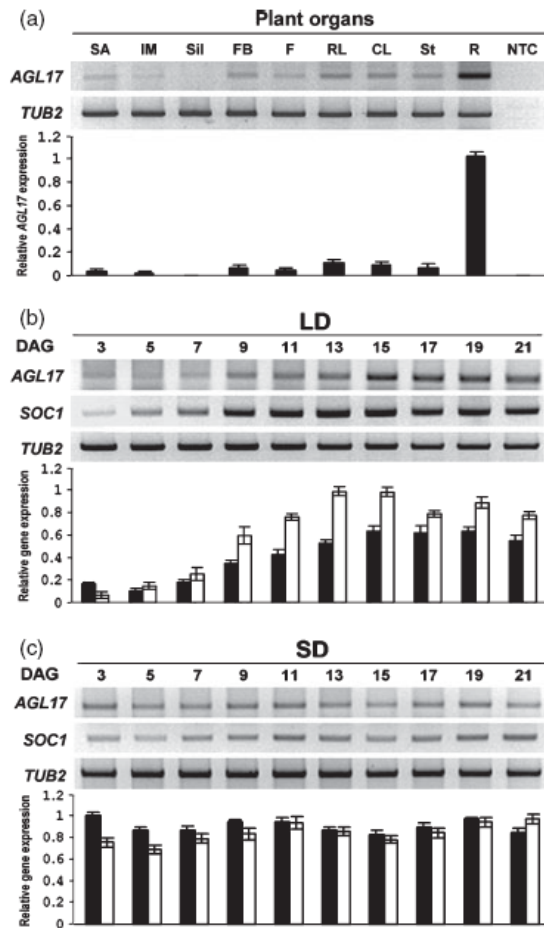


Figure 1. Expression of *AGL17* in wild-type Arabidopsis. (a) Spatial expression of *AGL17*. The upper panel shows *AGL17* expression in various organs of Col wild-type plants by semi-quantitative RT-PCR. The lower panel shows relative *AGL17* expression derived by normalization against *TUB2* levels. SA, shoot apex of 7-day-old seedlings (by excising roots and leaves); IM, inflorescence meristem; Sil, siliques; FB, flower buds; F, flowers; RL, rosette leaves; CL, cauline leaves; St, inflorescence stem; R, root; NTC, no-template control. Error bars represent \pm SD. (b and c) Temporal expression of *AGL17* and *SOC1* in the aerial part of Col wild-type plants grown under long days (LDs) (b) and short days (SDs) (c) starting from 3 days after germination (DAG). The upper panel shows the expression of *AGL17* and *SOC1* by semi-quantitative RT-PCR. The lower panel shows relative gene expression derived by normalization against *TUB2* levels. Open bars represent *SOC1* expression, while black bars represent *AGL17* expression.

contained an insertion of the transposon *En-1* at the sixth exon. There was no detectable expression of *AGL17* in either homozygous mutant line (Figure 2b), suggesting that *agl17-1* and *agl17-2* are null mutants. Under LD conditions, both *agl17-1* and *agl17-2* produced on average 16 and 15 rosette leaves, respectively, at the time of bolting, which was later than wild-type plants with on average 10 rosette leaves

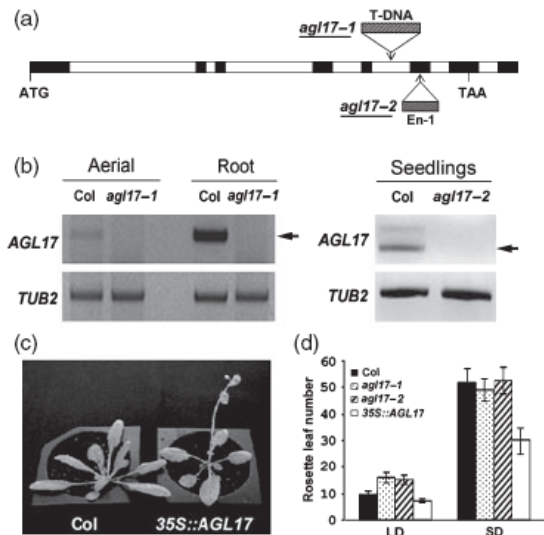


Figure 2. Modulation of *AGL17* expression affects flowering time. (a) Schematic diagram indicating the insertion sites of the T-DNA in *agl17-1* (Salk_140241) and *En-1* transposon in *agl17-2*. Exons are denoted by black boxes while introns are denoted by white boxes. The start (ATG) and stop (TAA) codons are labeled. (b) Semi-quantitative RT-PCR detection of *AGL17* expression in *agl17-1*, *agl17-2*, and Col wild-type plants. Arrows indicate *AGL17* expression in Col wild-type plants. Two pairs of primers used for detection of *AGL17* expression in *agl17-1* and *agl17-2* are indicated in Table 1. (c) Early flowering phenotype of a typical 35S::AGL17 transgenic plant. (d) Flowering time of *agl17-1*, *agl17-2*, and 35S::AGL17 plants grown under long days (LD) or short days (SD). Values are mean \pm SD for at least 20 plants.

(Figure 2d). However, both mutants flowered at approximately the same time as wild-type plants in SDs (Figure 2d). Apart from the flowering phenotype, we did not observe any other obvious developmental defects in *agl17-1* and *agl17-2*. To verify that the late-flowering phenotype of *agl17-1* was caused by loss of *AGL17* function, we transformed *agl17-1* with an *AGL17* genomic construct containing a 4.5 kb *AGL17* genomic fragment that includes 1 kb of the upstream sequence and 3.5 kb full coding sequence plus introns. Most of the resulting transformants showed comparable flowering time as wild-type plants under LDs (data not shown), indicating that the late-flowering phenotype of *agl17-1* is due to the loss of *AGL17*. These observations demonstrated that loss of function of *AGL17* resulted in a delay in flowering only under LDs, which mimicked the phenotypes of mutants in the photoperiod pathway, suggesting a role for *AGL17* in the regulation of flowering time under LDs.

Overexpression of AGL17 promotes flowering in Arabidopsis

To further assess the role of *AGL17* in the regulation of flowering, we generated 37 transgenic plants containing

AGL17 cDNA under the control of the strong cauliflower mosaic virus 35S promoter (*35S::AGL17*), among which 27 lines flowered earlier than wild-type plants with an average of seven rosette leaves at the time bolting under LDs. One of the earliest flowering transgenic lines with six rosette leaves at the time of bolting was chosen for further characterization (Figure 2c and d). Under non-inductive SD conditions, *35S::AGL17* plants flowered much earlier than wild-type plants but still produced more leaves than under LDs, thereby indicating that they remained responsive to photoperiod. These results showed that manipulation of *AGL17* expression affected flowering time, thereby confirming its regulation of flowering time in Arabidopsis.

Vernalization or GA does not affect *AGL17* expression

Control of flowering time in Arabidopsis is regulated via four major pathways, namely the photoperiod, vernalization, autonomous and GA pathways. To determine the effect of vernalization on *AGL17* expression, we used the late-flowering mutants *FRI FLC* and *fca-1* lines that showed strong acceleration of flowering by vernalization (Sheldon *et al.*, 2000). Cold treatment of *FRI FLC* and *fca-1* mutants for 6 weeks significantly downregulated the expression of floral repressor *FLC* in both plants, which, in turn, led to the upregulation of the expression of *FT* and *SOC1* (Figure 3a). However, *AGL17* expression was unaffected by vernalization in both *FRI FLC* and *fca-1* mutants (Figure 3a).

To examine whether *AGL17* expression is regulated under the GA-dependent pathway, *AGL17* transcript levels were analyzed in wild-type plants grown under SD with or without exogenous GA treatment. When 100 μ M GA was sprayed daily for 3–5 days on 7-week-old plants grown under SD conditions, *SOC1* expression was upregulated as compared to the mock treatment, while *AGL17* expression appeared unaffected by GA treatment (Figure 3b). These results indicate that the GA or vernalization pathways may not affect *AGL17* expression in the control of flowering time.

AGL17 acts downstream of *CO*

AGL17 expression was further studied in various late-flowering mutants to elucidate the possible involvement of *AGL17* in the floral promotive pathways. In the Columbia background, *AGL17* expression was found to decrease in the *co-1* mutant as compared to that in wild-type plants (Figure 3c), while its expression was unaffected by other mutants of the photoperiod pathway such as *gi-1* and *ft-1* (Figure 3c). In the *Ler* background, *AGL17* expression, like *FT*, was also significantly downregulated in the *co-2* mutant (Figure 3d). A recent study has demonstrated that *GIGANTEA* (*GI*)-regulated photoperiodic flowering is mediated by *miR172* and its targets independently of *CO*. Thus, it is possible that *AGL17* expression is differentially regulated by

CO and *GI* (Jung *et al.*, 2007). Expression of *AGL17* was unchanged in the autonomous pathway mutant *fve-3* (Figure 3c), indicating that *AGL17* may not be involved in the autonomous floral pathway. In addition, loss of function of *SOC1* and *AGL24* did not affect *AGL17* expression either (Figure 3c). These results suggest that *AGL17* may act primarily downstream of *CO*.

To further study the effect of the *co* mutant allele on the accumulation of *AGL17* mRNA, we compared the time course profile of *AGL17* expression in Col wild-type and *co-1* plants by real-time RT-PCR. Flowering was impeded in *co-1* mutants as indicated by the significant delay in accumulation of *LFY*, a floral meristem identity gene that mediates floral initiation (Figure 3e). In wild-type plants, *LFY* expression rapidly increased from 11 days after germination, but this upregulation of *LFY* was not observed in *co-1* mutants until 20 days after germination. The increase in *AGL17* expression was also significantly delayed in *co-1* mutants as transcript levels of *AGL17* were noticeably lower in *co-1* than in wild-type plants (Figure 3f). Thus, *AGL17* expression was positively regulated by *CO*, and it may play a role in the regulation of flowering via the photoperiod pathway.

CO upregulates *AGL17* expression

To confirm that *AGL17* expression is indeed regulated by *CO*, the levels of *AGL17* mRNA accumulation were also analyzed in *CO* and *GI* overexpression transgenic lines. Concomitant with the upregulation of *CO* expression in early flowering *35S::CO* and *35S::GI* plants, transcript levels of *AGL17* and *FT* were upregulated in these overexpression lines (Figure 4a), indicating that *CO* positively regulates the expression of *AGL17* and *FT*.

The expression of *AGL17* was further examined upon induction of *CO* activity by light (Wigge *et al.*, 2005). In an experimental group, wild-type plants, grown under an 8-h SD photoperiod, were exposed to 16 h of light, while a control group was exposed to 8 h of light followed by 8 h of darkness. Whole seedlings were harvested at the end of the 16-h period and the accumulation of *AGL17* transcripts was determined by semi-quantitative RT-PCR analysis. Consistent with the suggestion that *FT* is the major primary target of *CO* (Samach *et al.*, 2000; Wigge *et al.*, 2005), activation of the *CO* protein by light greatly increased *FT* transcript levels, while *FT* expression in the control was almost undetectable (Figure 4b). Stimulation of the endogenous *CO* activity also resulted in an almost twofold increase in *AGL17* mRNA levels, demonstrating the promotive effect of *CO* on *AGL17* expression.

CO is regulated by the circadian clock and shows a biphasic pattern of expression consisting of a late daytime and a night-time peak (Suarez-Lopez *et al.*, 2001). To determine whether *AGL17* transcript accumulation fluctuated

Figure 3. *AGL17* controls flowering via the photoperiod pathway.

(a) Effect of vernalization on *AGL17* expression. RNA was extracted from 11-day-old *FRI/FLC* (Col background) and 9-day-old *fca-1* (*Ler* background) seedlings grown in long-day (LD) conditions.

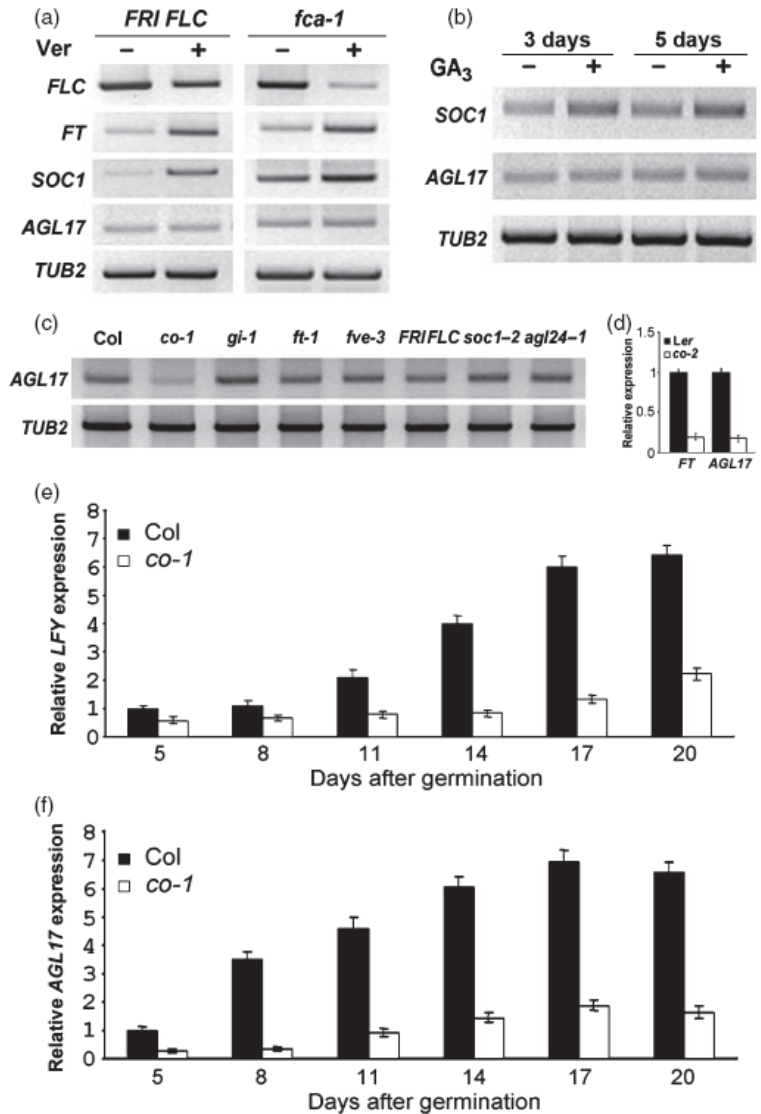
(b) Effect of gibberellin (GA) on *AGL17* expression. Gene expression was detected 3 and 5 days after daily treatment of 100 μ M GA on 7-week-old short-day (SD) grown wild-type plants.

(c) Expression of *AGL17* in late-flowering mutants (Col background). RNA was extracted from 11-day-old seedlings grown under LDs.

(d) Expression of *AGL17* and *FT* in *co-2* and wild-type plants (*Ler* background). RNA was extracted from 9-day-old seedlings grown under LDs.

(e and f) Temporal expression of *LFY* (e) and *AGL17* (f) in *co-1* and Col wild-type plants grown under LDs.

Gene expression was determined by semi-quantitative RT-PCR (a–c) or real-time RT-PCR (d–f). *TUB2* expression was amplified as a control. Error bars in (d–f) represent \pm SD.



within a 24-h cycle, 11-day-old wild-type plants were harvested every 2 h over a 24-h period under LDs and analyzed by real-time RT-PCR. *CO* mRNA levels oscillated under LD conditions with the highest expression occurring at 16 h and at dawn (Figure 5a). *FT* expression also showed a cyclic pattern with a peak at dusk when abundance of *CO* mRNA was also high (Figure 5b). Both patterns closely resembled that previously reported (Nakamichi *et al.*, 2007; Suarez-Lopez *et al.*, 2001). In *co-1* mutants, the peak in *FT* mRNA level was absent, which is consistent with the activation of *FT* by *CO* (Figure 5b). *AGL17* mRNA also cycled under LDs, with levels high in the early morning, decreasing during the day and increasing again at dusk (Figure 5c).

Concomitant with the suggestion that *CO* positively regulates *AGL17*, the accumulation of *AGL17* transcripts was significantly reduced and the oscillations in *AGL17* mRNA were absent in *co-1* mutants (Figure 5c).

The genetic interaction between *CO* and *AGL17* was further analyzed when *AGL17* transgenic or mutant plants were crossed with those of *CO*. The *35S::AGL17 co-1* plants flowered much earlier than *co-1* single mutant plants, demonstrating that *35S::AGL17* could partially suppress the late-flowering phenotype of *co-1*, although not completely since the crossed plants still flowered slightly later than wild-type plants (Figure 4c). Furthermore, *agl17-1* could partially suppress early flowering of

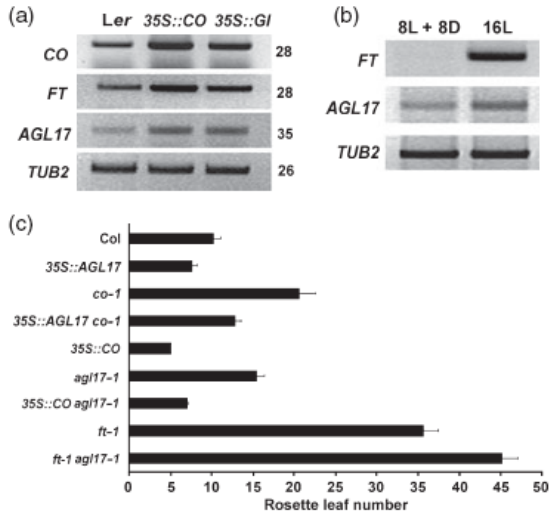


Figure 4. Regulation of *AGL17* expression by *CO*. (a) Expression of *CO*, *FT* and *AGL17* in transgenic *35S::CO* and *35S::Gl* lines. RNA was extracted from 9-day-old seedlings (Ler background) grown in long-day (LD) conditions. The number of PCR cycles used for amplification of each gene is indicated on the right. (b) Effect of *CO* induction on the expression of *FT* and *AGL17*. Three-week-old Col wild-type plants grown in short-day (SD) conditions were exposed to 16 h of light (16L) in the experimental group and 8 h of light followed by 8 h of darkness (8L + 8D) in the control group and harvested immediately after the 16-h period. (c) Flowering time of mutants or transgenic plants (Col background) grown under LDs. Error bars represent ±SD.

35S::CO. These genetic data suggest that the control of flowering time by *CO* is partially mediated by *AGL17*, and further corroborate that *AGL17* is one of the downstream targets of *CO*.

AGL17 affects the expression of *LFY* and *AP1*

To examine the molecular basis of the late-flowering phenotype of *agl17* loss-of-function mutants, the expression of flowering-related genes was analyzed in *agl17-1* plants by quantitative real-time PCR. In 11-day-old seedlings grown under LDs, there was no significant difference in mRNA levels of *CO*, *SOC1*, *FT*, *SVP* or *AGL24* between wild-type plants and *agl17-1* mutants (Figure 6a). In addition, *FT* expression was unchanged in *35S::AGL17* grown under LDs (Figure 6b). These results, together with the observation that *AGL17* expression was unaffected by *ft-1* (Figure 3c), demonstrated that *AGL17* and *FT* did not affect each other's expression, indicating that they may function in parallel downstream of *CO*. Genetic crossing further revealed that *ft-1 agl17-1* showed later flowering than either of the single mutants (Figure 4c), corroborating that *AGL17* and *FT* act in parallel in the photoperiod pathway.

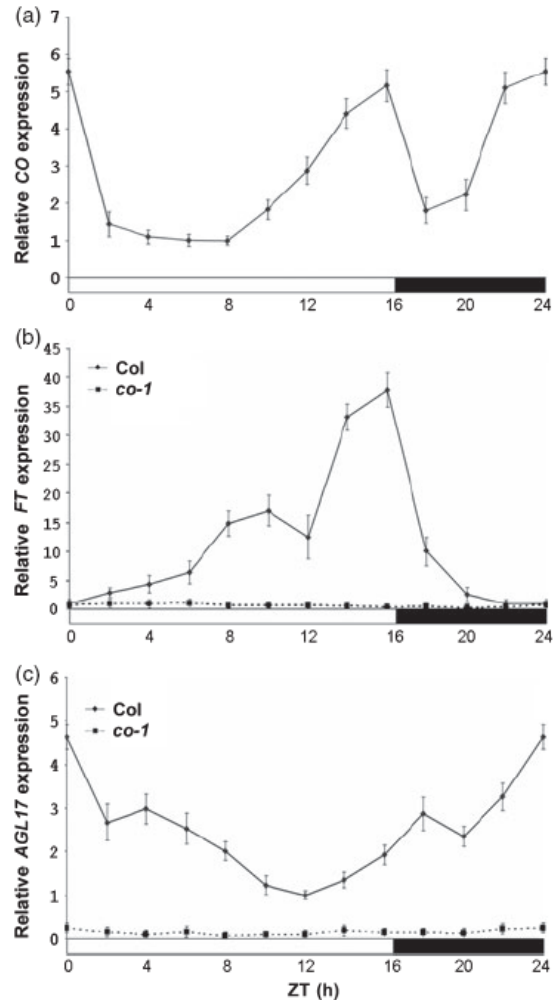
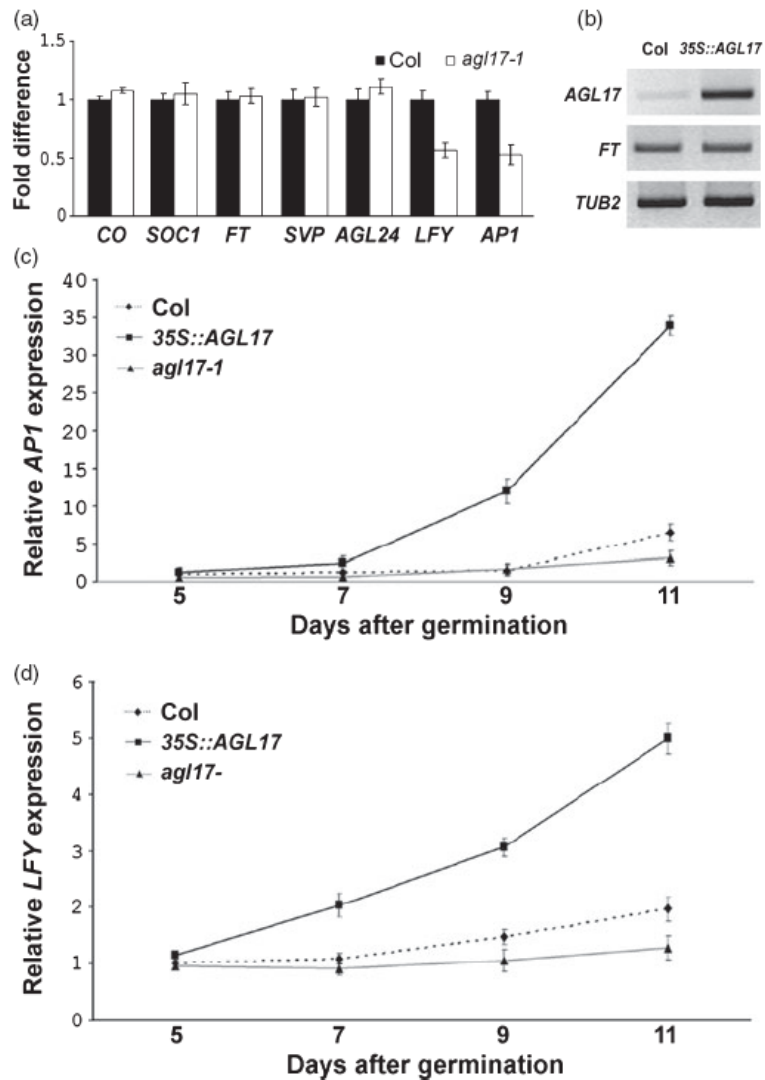


Figure 5. Diurnal oscillation of *CO*, *FT*, and *AGL17* mRNA abundance under long days (LDs). (a) *CO* expression in Col wild type. (b and c) Expression of *FT* (b) and *AGL17* (c) in Col wild type and *co-1* plants. Eleven-day-old Col wild type and *co-1* plants grown under LD conditions were harvested at 2-h intervals over a 24-h period. Relative gene expression was determined by real-time RT-PCR and normalized against *TUB2* levels. Error bars represent ±SD. Sampling time was expressed in hours as Zeitgeber time (ZT) which is the number of hours after dawn or the onset of illumination.

Expression of *LFY* and *AP1* was suppressed in *agl17-1* compared to wild-type plants (Figure 6a), suggesting that the late-flowering phenotype observed in *agl17-1* mutant plants was associated with downregulation of *LFY* and *AP1* expression. The expression of *LFY* and *AP1* was further examined over the floral transition phase in wild-type, *35S::AGL17* and *agl17-1* plants. The upregulation of *AP1* transcripts was observed 11 days after germination in wild-type plants, but an increase in *AP1* expression occurred

Figure 6. *AGL17* affects *LFY* and *AP1* expression. (a) Expression of flowering-related genes in *agl17-1* mutants. RNA was extracted from 11-day-old seedlings grown in long-day (LD) conditions. The fold difference was calculated by plotting the relative expression level in *agl17-1* against that in Col wild-type plants. Relative gene expression was determined by real-time RT-PCR and normalized against *TUB2* levels. Error bars represent \pm SD. (b) Expression of *AGL17* and *FT* in *35S::AGL17* (Col background). RNA was extracted from 9-day-old seedlings grown in LDs. (c and d) Temporal expression of *AP1* (c) and *LFY* (d) in Col wild-type, *35S::AGL17* and *agl17-1* plants grown under LDs. Plant samples were harvested at 2-day intervals over the period of floral transition. Relative gene expression was determined by real-time RT-PCR and normalized against *TUB2* levels. Error bars represent \pm SD.



much earlier in *35S::AGL17* plants, starting 7 days after germination and increasing steadily and rapidly thereafter (Figure 6c). Similarly, the upregulation of *LFY* expression occurred earlier with much higher levels in *35S::AGL17* plants than in wild-type plants (Figure 6d). Conversely, the levels of *LFY* and *AP1* mRNA were relatively low in *agl17-1* mutants throughout the floral transition period. These results indicate that *AGL17* promotes flowering by affecting the expression of *LFY* and *AP1*.

Induction of *AGL17* transcription activates *AP1* and *LFY*

We further created a functional pER22-*AGL17* transgenic line where overexpression of *AGL17* is controlled by an estro-

diol-induced XVE system (Figure 7a) (Zuo *et al.*, 2000). Based on this inducible system, *AGL17* expression is strongly activated upon induction by estradiol. pER22-*AGL17* transgenic plants grown on MS medium supplemented with 15 μ M estradiol flowered earlier than those subjected to a mock treatment (Figure 7b), demonstrating that upregulation of *AGL17* in the pER22-*AGL17* line was biologically functional and responsible for promoting flowering. Upon induction by estradiol, expression of *AGL17* was induced around fourfold in the first hour and fivefold in the second hour after treatment (Figure 7c). This, in turn, activated the expression of *LFY* and *AP1* as seen 2 and 4 h after estradiol treatment (Figure 7c). It is noteworthy that induction of *AGL17* caused more significant upregulation of *LFY*

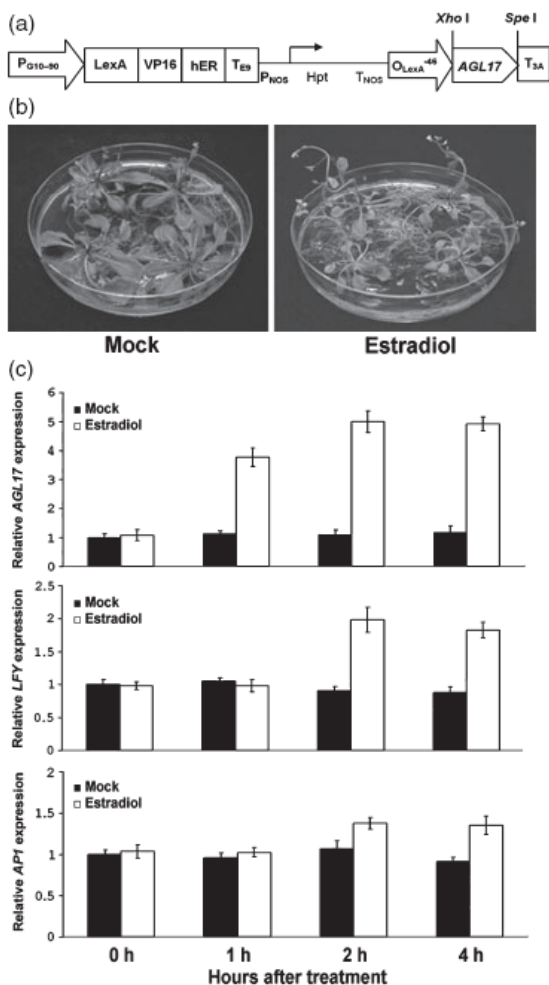


Figure 7. Activation of *LFY* and *AP1* expression upon *AGL17* induction. (a) Schematic diagram of the pER22-*AGL17* construct. (b) Flowering phenotype of pER22-*AGL17* transgenic plants upon hormone induction. (c) Expression of *AGL17*, *LFY* and *AP1* in 11-day-old pER22-*AGL17* seedlings, which were mock treated or treated with 15 μ M estradiol. Expression analyses were analyzed 0, 1, 2, and 4 h after treatment by real-time RT-PCR. Relative gene expression was derived by normalization against *TUB2* levels. Error bars indicate \pm SD.

than *AP1*, indicating that *AGL17* may more potently regulate *LFY*. This rapid induction of *LFY* and *AP1* by *AGL17* further supports the notion that *AGL17* is located upstream of *LFY* and *AP1* and promotes flowering by upregulating the expression of these two floral meristem identity genes.

Discussion

In *Arabidopsis*, *AGL17* belongs to the single monophyletic clade consisting of four *ANR1*-like genes, *ANR1*, *AGL17*,

AGL21, and *AGL16* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Becker and Theissen, 2003). Thus far, *ANR1* is the only *ANR1*-like gene for which phenotypes of gene downregulation have been reported. Transgenic plants in which *ANR1* expression is repressed exhibit an altered sensitivity to nitrate and fail to respond to nitrate-rich zones by lateral root proliferation, indicating that *ANR1* is a key regulator of lateral roots in response to signals from external nitrate (Gan *et al.*, 2005; Zhang and Forde, 1998). The *ANR1* clade appears to have an expression pattern restricted to vegetative tissues (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; De Bodt *et al.*, 2003). *ANR1*, *AGL17*, and *AGL21* have been previously reported to be preferentially expressed in roots, while *AGL16* is also found in roots, but is strongly expressed in the guard cells and trichomes of leaves (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000; Burgeff *et al.*, 2002; Rounsley *et al.*, 1995). Of the four genes, *AGL21* is most closely related to *AGL17*, sharing more than 70% amino acid sequence similarity (Burgeff *et al.*, 2002). *In situ* expression studies have showed that *AGL17* is expressed in the lateral root cap as well as the epidermal cells towards the elongation zone, while *AGL21* is highly expressed in the lateral root primordia and has a scattering expression pattern in the primary root meristem (Burgeff *et al.*, 2002). Because the mRNA expression patterns of *AGL17* and *AGL21* are non-overlapping, these two genes may not be functionally redundant.

It was previously reported that *AGL17* mRNA was almost undetectable in the aerial part of *Arabidopsis* plants by RNA gel blot hybridizations (Rounsley *et al.*, 1995). In this study, we have found that *AGL17* is expressed in most plant tissues using semi-quantitative RT-PCR analysis. Transcripts of *AGL17* are detectable in the shoot apex, inflorescence meristem, flower, leaf, and stem, albeit at lower levels, while it is highly expressed in the roots. Our results are in line with the expression profile of *AGL17* presented in Genevestigator, where data from collated microarray chip analyses show that *AGL17* is expressed in all plant tissues with the highest accumulation in the roots (Zimmermann *et al.*, 2004). Under floral inductive LD conditions, the temporal expression of *AGL17* is similar to that of another MADS-domain flowering regulator *SOC1* in that mRNA levels of both genes increase steadily during floral transition, indicating that *AGL17* may also be involved in the control of flowering. Like *SOC1* (Borner *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000), overexpression of *AGL17* in transgenic plants promotes flowering under both LDs and SDs. However, *agl17-1* loss-of-function mutants exhibit late flowering only under LDs, while *soc1* shows late flowering under both LDs and SDs (Lee *et al.*, 2000), indicating that *SOC1* and *AGL17* are differentially regulated during floral transition and that *AGL17* is at least involved in the photoperiod pathway. Besides an inductive LD photoperiod, *SOC1* expression is also positively regulated by the vernalization, autonomous and GA pathways (Lee *et al.*, 2000;

Moon *et al.*, 2003), which explains the late-flowering phenotype of *soc1* under both LDs and SDs. Nevertheless, *AGL17* expression is neither sensitive to vernalization and GA treatment, nor affected by the genes in the autonomous pathway. These results suggest that *AGL17* may be involved in the regulation of flowering via the photoperiod pathway.

In Arabidopsis, the photoperiod pathway acts predominantly through *CO* to induce the expression of floral integrators, *FT* and *SOC1*, to promote flowering (Onouchi *et al.*, 2000; Samach *et al.*, 2000). Loss-of-function *co* mutants flower late in inductive LDs, but show no difference in flowering time in SDs, whereas ectopic overexpression of *CO* promotes early flowering independently of day length, suggesting that *CO* promotes flowering in response to LD photoperiods (Onouchi *et al.*, 2000; Putterill *et al.*, 1995). Induction of the expression of a steroid-inducible *CO* fusion protein is sufficient to accelerate flowering under both LDs and SDs, indicating that the transcriptional regulation of *CO* is an important determinant of the photoperiodic regulation of flowering time (Simon *et al.*, 1996). Significantly low accumulation of *AGL17* mRNA in *co-1* mutants and the corresponding upregulation of *AGL17* expression in *CO* overexpression plants suggest that *AGL17* acts downstream of *CO* and is positively regulated by *CO*. Like the transgenic plants carrying increased copy numbers of the *CO* gene (Putterill *et al.*, 1995), *35S::AGL17* plants flowered much earlier than wild type under SDs than LDs. Therefore, it appears that *AGL17* expression is limiting, at least in part, the flowering time of wild type under SDs. Conversely, the *agl17-1* loss-of-function mutants flowered later than wild type under LDs but at about the same time as wild type under SDs, suggesting that *agl17-1* showed a reduced response to photoperiod. These observations confirm that *AGL17* acts in the photoperiod pathway.

The transcription of *CO* is governed by the circadian clock in a day length-dependent manner (Suarez-Lopez *et al.*, 2001). Under LD conditions, the peak in *CO* expression partly coincides with light whereby light perception via CRY2 and PHYA stabilizes the *CO* protein (Valverde *et al.*, 2004). The coincidence of circadian-controlled transcription of *CO* and light-mediated post-transcriptional regulation under these conditions results in the activation of *FT* expression and induces flowering (Valverde *et al.*, 2004; Yanovsky and Kay, 2002). The combination of circadian-clock-mediated regulation of the abundance of *CO* mRNA and stabilization of *CO* protein by exposure to light is also responsible for the increase in accumulation of *AGL17* mRNA during the late daytime (i.e., 12–16 h after dawn) observed in the diurnal cycle as well as after the transfer from SD to LD. However, *AGL17* transcript levels continue to remain high, even in the dark when *CO* protein is degraded by the proteasome (Valverde *et al.*, 2004). There is a possibility that *AGL17* undergoes positive autoregulation that allows its transcription to persist in spite of decreasing availability of its

inducer. Additional upstream regulators may also be responsible for the expression of *AGL17* in the dark. However, the observation that the accumulation of *AGL17* transcripts was significantly reduced in *co-1* (Figure 5c) implies that upregulation of *AGL17* is highly dependent on *CO*. Thus, other potential regulator(s) of *AGL17*, if they were present, could be controlled by *CO* as well.

FT is an early target gene of *CO* and has been suggested to be the major output of *CO*, positively regulating *SOC1* to promote flowering in Arabidopsis (Kobayashi *et al.*, 1999; Samach *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2005). Profiling experiments with plants moved from SDs to LDs show that *FT* is the gene specifically upregulated in leaves in a *CO*-dependent manner (Wigge *et al.*, 2005). Although *FT* plays a major role in the induction of flowering downstream of *CO*, it has been demonstrated that *CO* is capable of regulating flowering through both *FT*-dependent and *FT*-independent processes (An *et al.*, 2004). While introduction of the *ft-7* mutation into *SUC2::CO* plants, where *CO* expression is driven by a phloem-specific promoter, significantly suppresses the extreme early flowering induced by the expression of *CO* in the phloem, the plants still flower earlier than *ft-7* mutants, thus indicating that *CO* does not function exclusively through the activation of *FT*. There are several pieces of evidence in our study in support of *AGL17* being another target for *CO* independently of *FT*. First, induction of *CO* activity by the transfer from SDs to LDs leads to the activation of *AGL17* expression, albeit at a much lower level compared to that of *FT*, suggesting that *AGL17* is a target for *CO*. Second, overexpression of *AGL17* in *co-1* mutants largely suppresses the late-flowering phenotype of *co-1*, and *agl17-1* could also partially suppress early flowering of *35S::CO*, suggesting that *AGL17* could act genetically downstream of *CO*. Third, loss of *FT* function does not affect *AGL17* expression, and vice versa. Moreover, *FT* expression is not affected by overexpression of *AGL17*. These results indicate that *AGL17* and *FT* act in genetically parallel pathways in the control of flowering time. Lastly, *ft-1 agl17-1* shows flowering that is delayed much more than in either of the single mutants, substantiating that *AGL17* and *FT* act in parallel. Taken together, our findings suggest that *AGL17* is another downstream target of *CO* and functions in the regulation of flowering via the photoperiod pathway.

The genetic pathways controlling floral transition culminate in the activation of floral meristem identity genes, such as *LFY* and *AP1*, that ultimately act to specify the lateral primordia to develop into flowers (Bowman *et al.*, 1993; Weigel *et al.*, 1992). Overexpression of *LFY* not only causes precocious development of flowers but also results in early flowering, highlighting its role as a flowering time regulator (Nilsson *et al.*, 1998). Genes in the photoperiod pathway of floral induction, specifically *GI* and *CO*, are upstream regulators of *LFY* (Nilsson *et al.*, 1998). It has been shown that induction of *CO* leads to rapid accumulation of *LFY*

transcripts (Simon *et al.*, 1996). Consistent with the role of *CO* in the transcriptional regulation of *LFY*, it has been found that *LFY* promoter activity is much lower in *co-2* mutants compared with wild type (Nilsson *et al.*, 1998). In this study, it has also been shown that induction of *LFY* transcription is significantly delayed in *co-1* mutants. Similarly, accumulation of *AGL17* transcripts is significantly lower in *co-1* mutants, suggesting that the late-flowering phenotype of *co-1* may be partially attributable to the downregulation of *AGL17*, which, in turn, leads to the suppression of *LFY* expression. Indeed, *AGL17* has been found to positively regulate *LFY*, as transcription of *LFY* is activated in transgenic plants overexpressing *AGL17* and reduced in *agl17-1* mutants. Thus, the promotion and delay in flowering of *35S::AGL17* and *agl17-1* plants, respectively, is likely to be mediated through *LFY*, but independently of the other two floral pathway integrators *FT* and *SOC1*, because loss of function of *AGL17* does not affect the expression *FT* and *SOC1*, and vice versa.

LFY controls the developmental switch from vegetative to reproductive development, at least in part, by activating the expression of *AP1* in regions of the shoot apical meristem that give rise to flower primordia (Parcy *et al.*, 1998). In *lfy* mutants, the onset of *AP1* expression is delayed and *ap1-1* mutation partially suppresses the *35S::LFY* phenotype, indicating that *AP1* acts downstream of *LFY* in the floral transition (Liljegren *et al.*, 1999; Weigel and Nilsson, 1995). Post-translational activation of a biologically active LFY-GR fusion protein demonstrates that *LFY* activates *AP1* (Wagner *et al.*, 1999). Moreover, the LFY protein has been shown to bind to the *cis*-regulatory elements of *AP1*, indicating that *LFY* is a direct regulator of *AP1* (Parcy *et al.*, 1998; William *et al.*, 2004). In our study, the expression of both *LFY* and *AP1* is activated in response to the induced transcription of *AGL17*, but the former shows a much higher induction. A possible scenario is that *AGL17* upregulation of *AP1* is mediated by *LFY*.

In summary, characterization of the Arabidopsis MADS-box gene *AGL17* has revealed its novel function in flowering time control. *AGL17* plays a role in promoting flowering and acts downstream of *CO* in the photoperiod pathway. *AGL17*, together with *FT*, acts in parallel pathways to mediate the effect of *CO* on the induction of flowering by LDs (Figure 8). The promotive effect of *AGL17* on flowering is mediated by *LFY* and *AP1*. As *AGL17* is weakly expressed in the aerial part of plants, how *CO* spatially and temporally controls *AGL17* needs to be further investigated.

Experimental procedures

Plant materials and treatments

Seeds of *Arabidopsis thaliana* ecotypes Columbia or Landsberg *erecta* were stratified on soil for 3–4 days at 4°C before they were

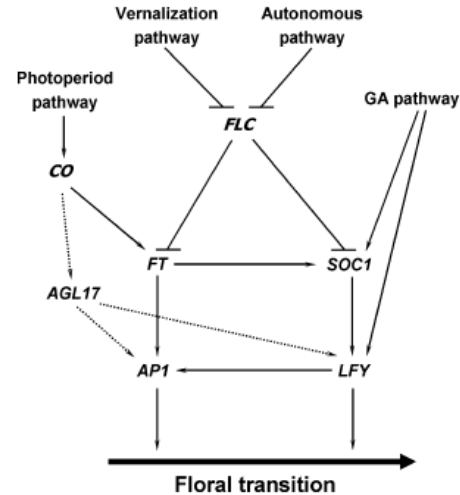


Figure 8. Proposed genetic locus of *AGL17* in the flowering regulatory network.

AGL17 acts downstream of *CO* and ultimately targets the floral meristem identity genes, *LFY* and *AP1*, to promote flowering. Promotive interactions are indicated by arrows while T-bars indicate repressive interactions. The scheme does not fully represent the complexity of the interactions among the flowering pathways. GA, gibberellin.

transferred into a controlled-environment growth chamber (Sanyo Medicals; <http://www.sanyo-biomedical.jp>) and grown at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ under LDs (16 h light/8 h dark) or SDs (8 h light/16 h dark). The flowering time was measured by scoring the total number of rosette leaves after bolting for at least 20 plants for each genotype. For vernalization studies, seeds were sown on soil and incubated for 6 weeks at 4°C. After the cold treatment, plants were transferred to growth chambers under LDs. Exogenous application of GA was carried out by spraying 7-week-old plants grown under SDs with 100 μM GA daily for up to five consecutive days.

For estradiol induction, pER22-*AGL17* plants were grown aseptically on Murashige and Skoog (MS) medium containing 4.4 g l^{-1} MS salts, 2% sucrose and 0.3% phytigel, pH 5.8. Seven-day-old seedlings grown under LDs were transferred to MS liquid medium (4.4 g l^{-1} MS salts, 2% sucrose, pH 5.8) supplemented with estradiol. Estradiol dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added at a final concentration of 15 μM and DMSO added alone served as the mock treatment.

Induction of endogenous CO activity by light was carried out according to Wigge *et al.* (2005). Col wild-type plants were grown under 8-h SD conditions for 3 weeks. On the day of the experiment, the experimental group was exposed to 16 h of light, while the control group was exposed to 8 h of light followed by 8 h of darkness. The plants were harvested at the end of the 16-h period.

Construction of binary vectors

For preparation of *35S::AGL17* construct, the *AGL17* coding region was amplified using primers *AGL17-Hind* (5'-CCCAAGCTTATGGGAGAGGGAAGATTGTGATC-3') and *AGL17-Spe* (5'-GACTAGT TTAGCTGTTGAAGATGTCTTATAATGGG-3'). The PCR products were digested with *HindIII* and *SpeI* and inserted into the corresponding sites of the pGreen 0229-35S binary vector (Yu *et al.*, 2004).

Table 1 Primers used quantitative RNA analysis

Primers pairs used for semi-quantitative RT-PCR		
AGL17 (for <i>agl17-1</i> and other studies)	5'-GCAACTAACGGGAGTGGAAAT-3'	5'-CTTATATGATCTTAGCTGTTTGAAG-3'
AGL17 (for <i>agl17-2</i>)	5'-CTACTATTGAACGATTCAATACGGCT-3'	5'-CTTTGGTTTGTCTCCGACATG-3'
CO	5'-CCAGTGCCATAACCAACAG-3'	5'-GCATCGTGTGAACCCCTTGC-3'
FLC	5'-CCAACGTCGCAACGGTCTC-3'	5'-GTCCAGCAGGTGACATCTCC-3'
FT	5'-GGAGAAGACCTCAGGAAC-3'	5'-AGGCATCATCACCGTTCG-3'
SOC1	5'-GCAACAAGCAGACAAGTGAC-3'	5'-GCTACTCTTTCATCACCTC-3'
TUB2	5'-ATCCGTGAAGAGTACCAGAT-3'	5'-TCACCTCTTTCATCCGAGTT-3'
Primers pairs used for real-time RT-PCR		
AGL17	5'-GACATCTTCAAACAGCTAAGATCA-3'	5'-CGAGAAGCTGTCCATTGC-3'
AGL24	5'-GAGGCTTTGGAGACAGATCGGTGA-3'	5'-CGAGAAGCTGTCCATTGC-3'
AP1	5'-CATGGGTGGTCTGTATCAAGAAGAT-3'	5'-CATGCGGCGAAGCAGCCAAGTT-3'
CO	5'-TCAGGGACTACTACAACGACAATGG-3'	5'-TTGGTGTGAAGCTGTTGTGACACAT-3'
FT	5'-CTTGGCAGGCAACAGTGTATGCAC-3'	5'-GCCACTCTCCCTCTGACAAATTGAGA-3'
LFY	5'-ATCGCTTGTCTGTCATGGCTG-3'	5'-GCAACCGCATTGTCCGCTC-3'
SOC1	5'-AGCTGCAGAAAACGAGAAGCTCTCTG-3'	5'-GGGCTACTCTTTCATCACCTCTCC-3'
SVP	5'-CAAGGACTTGACATGAAGAGCTTCA-3'	5'-CTGATCTCACTCATATCTGTGCAC-3'
TUB2	5'-GAGAATGCTGATGAGTGCATGG-3'	5'-AGAGTTGAGTTGACCAGGGAACC-3'

To generate an *AGL17*-inducible system, a derived pER22 vector containing the estrogen receptor-based transactivator XVE was used (Zuo *et al.*, 2000). For the construction of pER22-*AGL17*, the primers *AGL17-Xho* (5'-CCGCTCGAGATGGGGAGAGGGAAGATTG TGATC-3') and *AGL17-Spe* (5'-GACTAGTTAGCTGTTTGAAGATG TCTTATAATGGG-3') were used to amplify the *AGL17* cDNA and the resulting fragment was digested with *Xho*I and *Spe*I and cloned into the pER22 vector. All constructs were verified by sequence analyses using the Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com/>).

The *AGL17* genomic construct (pHY105-*gAGL17*) used for complementation consisted of a 4.5-kb genomic fragment that includes 1 kb of upstream sequence and the full coding sequence plus introns. The fragment was amplified from genomic DNA using primers *AGL17-PF* (5'-TCCCCGGGCAATATAGACGACTTGATATAGTTGGA-3') and *AGL17-PR* (5'-CGGGATCCTTAGCTGTTTGAAGATGCTTATAATGG-3'). The resulting PCR product was digested with *Sma*I and *Bam*HI and inserted into the corresponding sites of a modified pGreen binary vector pPHY105 (Liu *et al.*, 2007).

Arabidopsis transformation

Agrobacterium tumefaciens-mediated plant transformation was carried out by the floral dipping method (Clough and Bent, 1998). Seeds of 35S::*AGL17* and pHY105-*gAGL17 agl17-1* transgenic plants were sown directly on to soil and screened for herbicide resistance against Basta (300 mg l⁻¹). Seeds of pER22-*AGL17* were screened on MS medium supplemented with 15 µg ml⁻¹ hygromycin.

RNA analysis

For temporal analysis of *AGL17* expression, all of the samples were harvested at the same time of day to avoid the circadian modulation of gene expression. As strong expression of *AGL17* in the root masked the modulation of its expression in the aerial part, root tissues were removed from the seedlings used for gene expression analysis. Total RNA was extracted using RNeasy® Mini Kit (Qiagen, <http://www.qiagen.com/>) according to the manufacturer's instruc-

tions. After DNase treatment, total RNA was reverse transcribed using ThermoScript® RT-PCR System (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>). Semi-quantitative RT-PCR was performed with gene-specific primer pairs (Table 1) as previously described (Yu *et al.*, 2002). The PCR products were separated by electrophoresis on 1.6% agarose gel and stained with ethidium bromide. Quantification of expression levels was performed using Labworks® Image Acquisition and Analysis Software (UVP Inc.; <http://www.uvp.com>). Real-time PCR amplifications were carried out using the Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems) as previously reported (Liu *et al.*, 2007). The gene-specific primer pairs used are listed in Table 1. The β -tubulin gene (*TUB2*) was amplified as a quantitative control. All RT-PCR analyses were repeated three times using samples that were collected separately.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from plant tissues pulverized with a micropestle and homogenized in 200 µl of extraction buffer containing 0.2 M 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (TRIS)-Cl (pH 9.0), 0.4 M LiCl, 25 mM EDTA and 1% SDS. The cell debris was removed by centrifugation at 12 000 g for 5 min and the genomic DNA was precipitated by addition of an equal volume of isopropanol and retrieved by centrifugation at 12 000 g for 10 min. The DNA pellet was rinsed in 70% ethanol, spun down, air-dried and resuspended in TE buffer. For genotyping of *agl17-1* (Salk_140241), PCR amplification was performed using gene-specific primers flanking the insert (*AGL17-3*: 5'-GCTCTAGGCCTCTAGCTGG-3'; *AGL17-TAA*: 5'-TTAGCTGTTTGAAGATGTCTT-3') as well as the primer specific for the T-DNA (LBA1: 5'-TGGTTCACGTAGTGGCCATCG-3'). The *agl17-2* allele was identified by screening for *En-1* insertions among a collection of Arabidopsis plants carrying approximately 50 000 independent insertions of the autonomous maize transposable element (Baumann *et al.*, 1998). The collection was screened in pools using the *En-1* transposon primer En205 (5'-AGAGCACGACGGCTGTAGAATAGGA-3') and the internal *AGL17* primers (forward: 5'-CTACTATTGAACGATTCAATACGGCT-3'; reverse: 5'-CTTTGGTTTGTCTCCGACATG-3'). Verification of the

co-1 allele was carried out using CO-GT1 (5'-CTGCAAACCCA-CTTGCTAGA-3') and CO-GT2 (5'-ACCATTGTCTGTGTAGTGA-3'). The underlined sequences encode the three amino acids (leucine, alanine, and arginine) deleted in the *co-1* allele. Verification of the *ft-1* allele was performed using FT-1-GT-F (5'-CTACAATTGTCA-GAGGGAGAGTGGCTTCG-3') and FT-1-GT-R (5'-CAGCAGATTC-TTCCACTGCCTG-3'), whereby only the 340-bp PCR products generated from the mutant allele release a 27-bp fragment upon digestion with *BsBI*.

Acknowledgements

We thank Dr. George Coupland for the seeds of *35S:CO* and *35S:GI*, Drs. Rick Amasino and Marty Yanofsky for *agl2-1*, Dr Ilha Lee for *soc1-2* and *35S:SOC1*, and Nam-Hai Chua for the vector PER8. We also thank Soraya Pelaz for help in screening the *En-1* collection, Drs. Martin Yanofsky and Gary Ditta for support at initial stages of this work, Rigoberto V. Pérez-Ruiz for technical assistance and Dr. Yuehui He for critical reading of the manuscript. This work was supported by Academic Research Funds R-154-000-282-112 and R-154-000-337-112 from the National University of Singapore and R-154-000-263-112 from the Ministry of Education, Singapore, and the intramural research funds from Temasek Life Sciences Laboratory to HY. This work was also supported by grants from CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, Grant CO1.41848/A-1, CO1.0538/A-1 and CO1.0435/B-1), DGAPA, UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México, IN230002 and IX207104) to EAB. HP is on a research scholarship from the National University of Singapore. Seed stock of *agl17-1* allele was obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University, Columbus, OH, USA).

References

- Adamczyk, B.J., Lehti-Shiu, M.D. and Fernandez, D.E. (2007) The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **50**, 1007–1019.
- Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F. and Yanofsky, M.F. (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* **24**, 457–466.
- An, H., Roussot, C., Suarez-Lopez, P. et al. (2004) CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development*, **131**, 3615–3626.
- Ausin, I., Alonso-Blanco, C. and Martinez-Zapater, J.M. (2005) Environmental regulation of flowering. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 689–705.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J. and Weigel, D. (2006) Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.* **2**, e106.
- Baumann, E., Lewald, J., Sädler, H., Schulz, B. and Wisman, E. (1998) Successful PCR-based reverse genetic screens using an *En-1*-mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theor. Appl. Genet.* **97**, 729–734.
- Bäurle, I. and Dean, C. (2006) The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, **125**, 655–664.
- Becker, A. and Theissen, G. (2003) The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol. Phylog. Evol.* **29**, 464–489.
- Blázquez, M.A. and Weigel, D. (2000) Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*, **404**, 889–892.
- Blázquez, 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.
- 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**, 591–599.
- Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S. and Dean, C. (2004) Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell*, **16**, S18–S31.
- 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.
- Burgeff, C., Liljegren, S.J., Tapia-Lopez, R., Yanofsky, M.F. and Alvarez-Buylla, E.R. (2002) MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*, **214**, 365–372.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S. et al. (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, **316**, 1030–1033.
- De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y.V. and Theissen, G. (2003) And then there were many: MADS goes genomic. *Trends Plant Sci.* **8**, 475–483.
- Gan, Y., Filleur, S., Rahman, A., Gotensparre, S. and Forde, B.G. (2005) Nutritional regulation of *ANR1* and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **222**, 730–742.
- 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**, 351–360.
- 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**, 4327–4337.
- Jaeger, K.E. and Wigge, P.A. (2007) FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **17**, 1050–1054.
- Jung, J.H., Seo, Y.H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.H. and Park, C.M. (2007) The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19**, 2736–2748.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J. and Weigel, D. (1999) Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*, **286**, 1962–1965.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T. (1999) A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, **286**, 1960–1962.
- Lee, H., Suh, S.S., Park, E., Cho, E., Ahn, J.H., Kim, S.G., Lee, J.S., Kwon, Y.M. and Lee, I. (2000) The *AGAMOUS-LIKE 20* MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **14**, 2366–2376.
- Levy, Y.Y. and Dean, C. (1998) The transition to flowering. *Plant Cell*, **10**, 1973–1989.
- 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**, 1007–1018.
- 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**, 1901–1910.

- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F. and Schmid, M. (2007) Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **17**, 1055–1060.
- Michaels, S.D. and Amasino, R.M. (1999) *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, **11**, 949–956.
- Moon, J., Suh, S.S., Lee, H., Choi, K.Y., Hong, C.B., Paek, N.C., Kim, S.G. and Lee, I. (2003) The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signal for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* **35**, 613–623.
- Mouradov, A., Cremer, F. and Coupland, G. (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, **14**(suppl.), S111–S130.
- Nakamichi, N., Kita, M., Miinua, K., Ito, S., Yamashino, T., Mizoguchi, T. and Mizuno, T. (2007) *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiol.* **48**, 822–832.
- Ng, M. and Yanofsky, M. (2001) Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat. Rev. Gen.* **2**, 186–195.
- Nilsson, O., Lee, I., Blazquez, M.A. and Weigel, D. (1998) Flowering-time genes modulate the response to *LEAFY* activity. *Genetics*, **150**, 403–441.
- 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.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I. and Weigel, D. (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature*, **395**, 561–566.
- 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*, **8**, 847–857.
- Putterill, J., Laurie, R. and Macknight, R. (2004) It's time to flower: the genetic control of flowering. *Bio Essays*, **26**, 363–373.
- Ratcliffe, O.J., Nadzan, G.C., Reuber, T.L. and Riechmann, J.L. (2001) Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an FLC homologue. *Plant Physiol.* **126**, 122–132.
- 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**, 1159–1169.
- Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* **378**, 1079–1101.
- Rounsley, S.D., Ditta, G.S. and Yanofsky, M.F. (1995) Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, **7**, 1259–1269.
- 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**, 1613–1616.
- Schönrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Köhler, C., Gruitsem, W. and Hennig, L. (2006) Polycomb-group proteins repress the floral activator *AGL19* in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev.* **20**, 1667–1678.
- Scortecci, K.C., Michaels, S.D. and Amasino, R.M. (2003) Identification of a MADS-box gene, *FLOWERING LOCUS M*, that represses flowering. *Plant J.* **26**, 229–236.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Krüber, S., Amasino, R.A. and Coupland, G. (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **20**, 898–912.
- Sheldon, C.C., Rouse, D.T., Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (2000) The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C* (FLC). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 3753–3758.
- Simon, R., Igeno, M.I. and Coupland, G. (1996) Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature*, **384**, 59–62.
- Simpson, G.G. and Dean, C. (2002) *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time? *Science*, **296**, 285–289.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. (2001) *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, **410**, 1116–1120.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A. and Coupland, G. (2004) Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering. *Science*, **303**, 1003–1006.
- Wagner, D., Sablowski, R.W.M. and Meyerowitz, E.M. (1999) Transcriptional activation of *APETALA 1* by *LEAFY*. *Science*, **285**, 582–584.
- Weigel, D. and Nilsson, O. (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, **377**, 495–500.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M. (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, **69**, 843–859.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U. and Weigel, D. (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, **309**, 1056–1059.
- 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. USA*, **101**, 1775–1780.
- Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature*, **419**, 308–311.
- Yoo, S.K., Chung, K.S., Kim, J.K., 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 T* through flowering locus *T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**, 770–778.
- 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. USA*, **99**, 16336–16341.
- 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**, 157–161.
- Zhang, H. and Forde, B.G. (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, **279**, 407–409.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W. (2004) *GENEVESTIGATOR*: *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**, 2621–2632.
- Zuo, J., Niu, Q.W. and Chua, N.H. (2000) An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* **24**, 265–273.

10. Anexo 3

Análisis de la función de *AGL21* en la transición a la floración y en el desarrollo vegetativo del vástago aéreo. Análisis de redundancia funcional entre *AGL17* y *AGL21* en estos procesos.

AGL21 es el gene que presenta mayor similitud con *AGL17* (Martínez-Castilla y Álvarez-Buylla, 2003⁹⁷), dado que este último participa en la inducción de la floración a través de la vía del fotoperiodo (Han *et al.*, 2008¹¹³ en Anexo 2), existe la posibilidad de que *AGL21* también participe en este proceso.

Se analizó el tiempo (número de dps) y la etapa de desarrollo (número de hojas totales de la roseta) en los que ocurre la transición a la floración (interpretada como el momento en el que el eje de la inflorescencia alcanza una altura de 1 cm) de las líneas de pérdida de función *spm-agl21* y *w-agl21* (Figura 4) bajo un régimen de fotoperiodo de días largos, y se observó que ambas líneas desarrollaban mayor número de hojas con respecto a la línea de tipo silvestre en el momento de la floración, siendo la línea *w-agl21* la que presentaba un fenotipo más acentuado (Figura 13). Sin embargo, en este experimento no se observaron diferencias en el número de dps en el momento de la floración entre las líneas de pérdida de función de *AGL21* y la línea de tipo silvestre (datos no mostrados).

Al mismo tiempo, se analizó el efecto de la pérdida de función simultánea de *AGL17* y *AGL21* en la transición a la floración y se observó que en el mutante doble *spm-agl21, gk-agl17* el número de hojas totales de la roseta es el mismo que desarrollan los mutantes simples *gk-agl17* y *spm-agl21* (Figura 13) y tampoco presentó una diferencia con respecto a las plantas de tipo silvestre en el número de dps en el momento de la transición a la floración (datos no mostrados). Es importante señalar que el alelo de pérdida de función *gk-agl17* usado en estos análisis resultó presentar un fenotipo muy débil comparado con el de los alelos ya reportados (Han *et al.*, 2008¹¹³ en Anexo 2) considerando el tiempo de floración, aunque sí muestra un retraso al considerar la etapa de desarrollo en la que ocurre esta transición (número de hojas de la roseta, Figura 13).

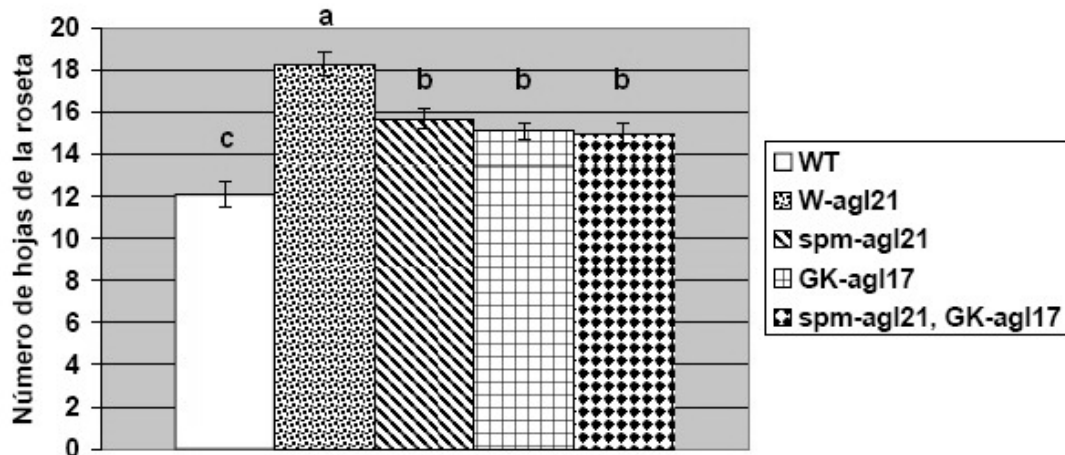


Figura 13. Etapa de desarrollo (número total de hojas de roseta desarrolladas) en la que ocurre la transición a la floración en las líneas de pérdida de función *w-agl21*, *spm-agl21*, *gk-agl17* y en la mutante doble *spm-agl21*, *gk-agl17*. Las barras con letras distintas representan medias significativamente diferentes de acuerdo a la prueba de Mann-Whitney ($P < 0.05$). $N = 35-37$. Las líneas en la parte superior de cada barra representan el error estándar.

Concluyendo, tanto la pérdida de función de *AGL17* como de *AGL21* generan un mayor desarrollo vegetativo que las líneas de tipo silvestre hacia el momento de la transición a la floración que puede interpretarse como un retraso en su desarrollo no correlacionado con el requerimiento temporal (el número de días).

11. Anexo 4

Secuencias de los oligonucleótidos* usados en la genotipificación.

Alelo <i>AGL17</i> de tipo silvestre	5'TCTAGCATTTTATTTCTAAAATTT 5'CTTTGGTTTGCTCCCGACATG	y
Alelo <i>gk-agl17</i>	5'CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC 5'CTTTGGTTTGCTCCCGACATG	y
Alelo <i>w-agl17</i>	5'AGAAGCACGACGGCTGTAGAATAGGA 5'CTTTGGTTTGCTCCCGACATG	y
Alelo <i>AGL21</i> de tipo silvestre	5'GAACCCCGCATCAGAAGTCAAG 5'CGAATCTGAGTGTGTG	y
Alelo <i>w-agl21</i>	5'AGAAGCACGACGGCTGTAGAATAGGA 5'CGAATCTGAGTGTGTG	y
Alelo <i>spm-agl21</i>	5'GAACCCCGCATCAGAAGTCAAG 5'GTTTTGGCCGACACTCCTTACC	y
Alelo <i>AGL16</i> de tipo silvestre	5'CCGAGAGGTGGGACTATGGTT 5'TTTTCGCTTATGCAGAGGCAAG	y
Alelo <i>agl16</i>	5'CCGAGAGGTGGGACTATGGTT 5'GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	y
Alelo <i>ANR1</i> de tipo silvestre	5'GTTAATACCTTCTTGTGTGTGT 5'CGAGATAACACTGTTCGATAG	y
Alelo <i>anr1-2</i>	5'GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 5'CGAGATAACACTGTTCGATAG	y
Alelo <i>SOC1</i> de tipo silvestre	5'AAGCAGAGAGAGAAGAGACGAGTG 5'GGAGCTGGCGAATTCATAAAG	y
Alelo <i>soc1</i>	5'AAGCAGAGAGAGAAGAGACGAGTG 5'TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	y

* En todos los casos, la primera secuencia corresponde al aligonucleótido sentido y la segunda al anti-sentido.

Secuencias de los oligonucleótidos y condiciones de reacción usadas en los análisis de expresión genética por RT-PCR.

Gene	Oligonucleótidos*	Condiciones de reacción
<i>AGL17</i>	5'CAAAAAAGCAGGCTTAATGGGGA GAGGGAAGATTG 5'GTACAAGAAAGCTGGGTTTAGCT GTTTGAAGATGTCT	54 °C en alineamiento, 1' de extensión y 30 ciclos
<i>CYCA2;1</i>	5'GCTCCAGCTACTTGGTATC 5'AAGCGGCAATTAGGATGG	57 °C en alineamiento, 45'' de extensión y 30 ciclos
<i>CYCB1;1</i>	5'CTGTCTACACTTGAGTGGTA 5'GAATGAATCATGCTAAAGGAC	56 °C en alinemaiento, 45'' de extensión y 30 ciclos
<i>CYCD3;1</i>	5'GGTGCCTTAACTTAAACCA 5'GCAAGCCTCAAATTTACGC	56 °C en alineamiento, 45'' de extensión y 35 ciclos

<i>KRP2</i>	5'CGTGGATTTACGATGATTTGAAT 5'CTAATTAATTACCTCAAGGAAG	57 °C en alineamiento, 45'' de extensión y 35 ciclos
<i>TUB</i>	5'AGGACTCTCAAACCTCACTACC y 5'TCACCTTCTTCATCCGCAGTT	62 °C en alineamiento, 45'' de extensión y 28 ciclos

* En todos los casos, la primera secuencia corresponde al aligonucleótido sentido y la segunda al anti-sentido.

12. Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AGL	AGAMOUS-LIKE
ANR1	ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1
API	APETALA 1
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CAK	CDK Activating Kinase
CDF1	CYCLING DOF FACTOR 1
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CLE	CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION-LIKE
CLV3	CLAVATA 3
CO	CONSTANS
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1
CQ	centro quiescente
CYC	Cyclin
DP	Dimerization Partner
DMSO	dimetil-sulfóxido
dps	días posteriores a la siembra
E2F	adenovirus E2 promoter-binding factor
FD	FLOWERING LOCUS D
FKF1	FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1
FT	FLOWERING LOCUS T
FUL	FRUITFUL
GI	GIGANTEA
KRP/ICK	Kip-related CDK inhibitor / Interactor of Cdc2 kinase
LFY	LEAFY
MS	Murashige y Skoog
PLT	PLETHORA
PRR	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR
PRZ1	PROPORZI
RAM	meristemo apical de la raíz
RBC	reloj biológico circadiano
RBR	RETINOBLASTOMA-RELATED
RT-PCR	Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa
SAM	meristemo apical del vástago aéreo
SAP18	Sin3A-associated protein
SCF	SKP1/CUL-1/F-box protein E3 ubiquitin ligase complex
SCR	SCARECROW
SEP3	SEPALLATA 3
SHR	SHORT ROOT
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
SPA1	SUPPRESSOR OF PHYA-1
WOX5	WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5
WUS	WUSCHEL
XAL1	XAANTAL1, también AGL12

13. Referencias

- ¹Meyerowitz E M. (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**: 1482-1485.
- ² Vernoux T and PN Benfey. (2005). Signals that regulate stem cell activity during plant development. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 388-394.
- ³ Beemster G and T Baskin. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**: 1515-1526.
- ⁴ Nakajima K and Benfey P N. (2002). Signaling in and out: control of cell division and differentiation in the shoot and root. *Plant Cell* **14 (Suppl)**: S265-S276.
- ⁵ Tucker M R and T Laux. (2007). Connecting the paths in plant stem cell regulation. *TRENDS in Cell Biology*. **17**: 403-410.
- ⁶ van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P and Scheres B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* **390**: 287-289.
- ⁷ Baluska F, Mancuso S, Volkmann D and Barlow P W. (2010). Root apex transition zone: a signalling-response nexus in the root. *Trends Plant Sci* **15**: 402-408.
- ⁸ Ivanov V and J Dubrovsky. (1997). Estimation of the cell-cycle duration in the root apical meristem: a model of linkage between cell-cycle duration, rate of cell production, and rate of cell growth. *Int J of Plant Sci* **158**: 757-763.
- ⁹ van der Weele C M, Jiang H S, Palaniappan K K, Ivanov V B, Palaniappan K and Baskin T I. (2003). A new algorithm for computational image analysis of deformable motion at high spatial and temporal resolution applied to root growth. Roughly uniform elongation in the meristem and also, after an abrupt acceleration, in the elongation zone. *Plant Physiol* **132**: 1138-1148.
- ¹⁰ Dolan L, Jammatt K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K and Scheres B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84.
- ¹¹ Stahl Y and Simon R. (2005). Plant stem cell niches. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 479-489.
- ¹² Scheres B, Benfey P and Dolan L. (2002) Root development. September 30, 2002. The *Arabidopsis* Book. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0101, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- ¹³ Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra T and Laux T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811-814.
- ¹⁴ Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy J E, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn M G, Feldmann K A and Benfey P N. (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* **86**: 423-433.
- ¹⁵ Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser M T and Benfey P N. (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* **101**: 555-567.
- ¹⁶ Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M and Scheres B. (2003). *SCARECROW* is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev.* **17**: 354-358.
- ¹⁷ Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R and Scheres B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**: 109-120.
- ¹⁸ Xu J, Hofthuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J and Scheres B. (2006). A molecular framework for plant regeneration. *Science* **311**: 385-388.
- ¹⁹ Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R and Scheres B. (2007). *PLETHORA* proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* **449**: 1053-1057.
- ²⁰ Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R and Scheres B. (2005). The PIN efflux facilitator network controls growth and patterning in the *Arabidopsis* root. *Nature* **433**: 39-44.
- ²¹ Zazimalová E, Murphy A S, Yang H, Hoyerová K and Hosek P. (2010). Auxin transporters-why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2(3)**: a001552.
- ²² Azpeitia E, Benítez M, Vega I, Villareal C and Álvarez-Buylla ER. (2010). Single-cell and coupled GRN models for cell patterning in the *Arabidopsis thaliana* root stem cell niche. *BMC Syst Biol* **4**: 134.

- ²³ Miwa H, Kinoshita A, Fukuda H and Sawa S. (2009). Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *J Plant Res* **122**: 31-39.
- ²⁴ Casamitjana-Martínez E, Hofhuis HF, Xu J, Liu CM, Heidstra R and Scheres B. (2003). Root-specific CLE19 overexpression and the *sol1/2* suppressors implicate a CLV-like pathway in the control of Arabidopsis root maintenance. *Curr Biol* **13**: 1435-1441.
- ²⁵ Fiers M, Hause G, Boutilier K, Casamitjana-Martínez E, Weijers D, Offringa R, van der Geest L, van Lookeren Campagne M and Liu CM. (2004). Mis-expression of the CLV3/ESR-like gene CLE19 in Arabidopsis lead to a consumption of root meristem. *Gene* **227**: 37-49.
- ²⁶ Stahl Y, Wink RH, Ingram GC and Simon R. (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems. *Curr Biol* **19**: 1-6.
- ²⁷ Stahl Y and R Simon. (2010). Plant primary meristems: shared function and regulatory mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 53-58.
- ²⁸ Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martínez E, Heidstra R, Constantino P and Sabatini S. (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**: 678-682.
- ²⁹ Shishkova S, Rost TL and Dubrovski JG. (2008). Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Ann Bot* **101**: 319-340.
- ³⁰ Sablowski R. (2007). The dynamic plant stem cell niches. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 639-644.
- ³¹ Ruzicka K, Simaskova M, Duclercq J, Petrsek J, Zazimalova E, Simon S, Frimi J, Van Montagu MC and Benkova E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *PNAS* **106**: 4284-4289.
- ³² Wildwater M, Campilho A, Pérez-Pérez JM, Heidstra R, Blilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Grissem W and Scheres B. (2005). The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem-cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell* **123**: 1337-1349.
- ³³ Francis D. (2007). The plant cell cycle – 15 years on. *New Phytologist* **174**: 261-278.
- ³⁴ Gutiérrez C. (2009). The Arabidopsis cell division cycle: March 20, 2009. The Arabidopsis Book. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0120, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- ³⁵ Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Morgan DO, Franza BR and Roberts JM. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**: 1689-1694.
- ³⁶ Menges M, de Jager SM, Grissem W and Murray JA. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* **41**: 546-566.
- ³⁷ Porceddu A, Stals H, Reichheld JP, Segers G, De Veylder L, Barroco LP, Casteels P, Van Montagu M, Inzé D and Mironov V. (2001). A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *J Biol Chem* **276**: 36354-36360.
- ³⁸ Boudolf V, Vieghe K, Beemster GT, Magyar Z, Acosta JA, Maes S, Van Der Schueren E, Inzé D and Veylder L. (2004). The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control de ballance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2683-2692.
- ³⁹ Shimotohno A, Ohno R, Bisova K, Sakaguchi N, Huang J, Koncz C, Uchimiya H and Umeda M. (2006). Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in Arabidopsis. *Plant J* **47**: 701-710.
- ⁴⁰ Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A and Fleck J. (1998). Cell cycle-dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* **10**: 2063-2076.
- ⁴¹ Weingartner M, Criqui MC, Meszaros T, Binarova P, Schmit AC, Helfer A, Derevier A, Erhardt M, Bogre L and Genschik P. (2004). Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* **16**: 643-657.
- ⁴² Planchais S, Samland AK and Murray JA. (2004). Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J* **38**: 616-625.
- ⁴³ Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, DePamphilis CW and Ma H. (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* **135**: 1084-1099.

-
- ⁴⁴ Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S and Inzé D. (2002). Genome-wide analysis of the core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 903-916.
- ⁴⁵ Ito M. (2000). Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol* **43**: 677-690.
- ⁴⁶ Wang H, Fowke LC and Crosby WL. (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* **386**: 451-452.
- ⁴⁷ Lui H, Wang H, Delong C, Fowke LC, Crosby WL and Fobert PR. (2000). The Arabidopsis Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity in vitro. *Plant J* **21**: 379-385.
- ⁴⁸ De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu L, van der Schueren E, Maes S, Naudts M and Inzé D. (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1653-1668.
- ⁴⁹ Zhou Y, Wang H, Glimmer S, Whitwill S and Fowke LC. (2003). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in Arabidopsis thaliana. *Planta* **216**: 604-613.
- ⁵⁰ Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL and Fowke LC. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**: 501-510.
- ⁵¹ Nakai T, Kato K, Shinmyo A and Sekine M. (2006). Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Letters* **580**: 336-340.
- ⁵² Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S and Fowke LC. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J* **24**: 613-623.
- ⁵³ Himanen K, Boucheron E, Vanneste D, de Almeida Engler J, Inzé D and Beeckman T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339-2351.
- ⁵⁴ Kim HJ, Oh, SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D and Nam HG. (2008). Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* **455**: 1134-1137.
- ⁵⁵ Ramírez-Parra E and C Gutiérrez. (2000). Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett* **486**: 73-78.
- ⁵⁶ de Jager SM, Menges M, Bauer UM and Murray JA. (2001). Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol Biol* **47**: 555-568.
- ⁵⁷ Stevens R, Mariconti L, Rossignol P, Perennes C, Cella R and Bergounioux C. (2002). Two E2F sites in Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *J Biol Chem* **277**: 32978.32984.
- ⁵⁸ Ramírez-Parra E, Frundt C and Gutiérrez C. (2003). A genome-wide identification of E2F regulated genes in Arabidopsis. *Plant J* **33**: 801-811.
- ⁵⁹ Díaz-Trivino S, Castellano MM, Sánchez MP, Ramírez-Parra E, Desvoyes B and Gutiérrez C. (2005). The genes encoding Arabidopsis ORC subunits are E2F targets and the two ORC1 genes are differentially expressed in proliferating and endoreplicating cells. *Nucleic Acids Res* **33**: 5404-5414.
- ⁶⁰ Lendvai A, Pettkó-Szantdner A, Csordás-Tóth E, Miskolczi P, Hórvath GV, Györgyey J and Dudits D. (2007). Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot* **58** (7): 1663-1675.
- ⁶¹ Uemukai K, Iwakawa H, Kosugi S, de Uemukai S, Kato K, Kondorosi E, Murray JA, Ito M, Shinmyo A and Sekine M. (2005). Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol Biol* **57**: 83-100.
- ⁶² Gutiérrez C, Ramírez-Parra E, Castellano MM and del Pozo JC. (2002). G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin in Plant Biol* **5**: 480-486.
- ⁶³ Menges M, Samland AK, Planchais S and Murray JA. (2006). The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 893-906.
- ⁶⁴ Inzé D and De Veylder L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**: 77-105.
- ⁶⁵ Boniotti MB and C Gutiérrez. (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in Arabidopsis, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J* **28**: 341-350.

- ⁶⁶ Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M and Shinmyo A. (2002). Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1847-1857.
- ⁶⁷ Rossignol P, Stevens R, Perennes C, Jasinski S, Cella R, Tremousaygue D and Bergounioux C. (2002). AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F-family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S-phase. *Mol Genet Genom* **266**: 995-1003.
- ⁶⁸ Sozzani R, Maggio C, Varotto S, Canova S, Bergounioux C, Albani D and Cella R. (2006). Interplay between Arabidopsis activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol* **140**: 1355-1366.
- ⁶⁹ de Jager SM, Scofield S, Huntley RP, Robinson AS, den Boer BG and Murray JA. (2009). Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2Fc. *Plant Mol Biol* **71**: 345-365.
- ⁷⁰ Del Pozo JC, Boniotti MB and Gutiérrez C. (2002). Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* **14**: 3057-3071.
- ⁷¹ Del Pozo JC, Díaz-Trivino S, Cisneros N and Gutiérrez C. (2006). The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 2224-2235.
- ⁷² Kono A, Umeda-Hara C, Lee J, Ito M, Uchimiya H and Umeda M. (2003). Arabidopsis D-type cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiol* **132**: 1315-1321.
- ⁷³ Verkest A, de O Manes C-L, Vercruyse S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D and De Veylder L. (2005). The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* **17**: 1723-1736.
- ⁷⁴ Boudolf V, Inzé D and De Veylder L. (2006). What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? *Trends Plant Sci* **11**: 474-479.
- ⁷⁵ Kellogg D R. (2003). Wee-1 dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J Cell Sci* **116**: 4883-4890.
- ⁷⁶ Boutros R, Dozier C and Ducommun B. (2006). The where and when of CDC25 phosphatases. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 185-191.
- ⁷⁷ Ito M, Araki S, Matsunaga S, Itoh T, Nishihama R, Machida Y, Doonan JH and Watanabe A. (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**: 1891-1905.
- ⁷⁸ Araki S, Ito M, Soyano T, Nishihama R and Machida Y. (2004). Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J Biol Chem* **279**: 32979-32988.
- ⁷⁹ Ramos GB, de Almeida Engler J, Ferreira PC and Hemerly AS. (2001). DNA replication in plants: characterization of a cdc6 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **52**: 2239-2240.
- ⁸⁰ Castellano MM, del Pozo JC, Ramírez-Parra E, Brown S and Gutiérrez C. (2001). Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreplication. *Plant Cell* **13**: 2671-2686.
- ⁸¹ Sieberer T, Hauser MT, Seifert GJ and Luschnig C. (2003). PROPORZ1, a putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Curr Biol* **13**: 837-842.
- ⁸² Burssens S, de Almeida Engler J, Beeckman T, Richard C, Shaul O, Ferreira P, Van Montagu M and Inzé D. (2000). Developmental Expression of the *Arabidopsis thaliana* CycA2;1 gene. *Planta* **211**: 623-631.
- ⁸³ Soni R, Carmichael JP, Shah ZH and Murray JA. (1995). A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**: 85-103.
- ⁸⁴ Swiatek A, Lenjou M, Van Bockstaele D, Inzé D and Van Onckelen H. (2002). Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol* **128**: 201-211.
- ⁸⁵ Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G and Inzé D. (1993). cdc2a expression in Arabidopsis is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**: 1711-1723.
- ⁸⁶ Asahina M, Iwai H, Kikuchi A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Kamada H and Satoh S. (2002). Gibberellin produced in the cotyledons is required for cell division during tissue reunion in the cortex of cut cucumber and tomato hypocotyls. *Plant Physiol* **129**: 201-210.

- ⁸⁷ Sauter M. (1997). Differential expression of a CAK (cdc2-activating kinase)-like protein kinase, cyclins and cdc2 genes from rice during the cell cycle and in response to gibberellin. *Plant J* **11**: 181-190.
- ⁸⁸ Fabian T, Lorbiecke R, Umeda M and Sauter M. (2000). The cell cycle genes *cycA1;1* and *cdc2Os-3* are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta* **211**: 376-383.
- ⁸⁹ Kazama H, Dan H, Imaseki H and Wasteneys GO. (2004). Transient exposure to ethylene stimulates cell division and alters the fate and polarity of hypocotyl epidermal cells. *Plant Physiol* **134**: 1614-1623.
- ⁹⁰ Ortega-Martínez O, Pernas M, Carol JR and Dolan L. (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* **317**: 507-510.
- ⁹¹ Love J, Björklund S, Vahala J, Hertzberg M, Kangasjärvi J and Sundberg B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *PNAS* **106**: 5984-5989.
- ⁹² Hu Y, Bao F and Li J. (2000). Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**: 693-701.
- ⁹³ Zhang Y and JG Turner. (2008). Wound-induced endogenous jasmonates stunt plant growth by inhibiting mitosis. *PLoS ONE* **3**: e3699.
- ⁹⁴ Tapia-López R, García-Ponce B, Dubrovsky JG, Garay-Arrollo A, Pérez-Ruiz RV, Kim SH, Acevedo F, Pelaz S and Álvarez-Buylla ER. (2008). An *AGAMOUS*-related MADS-box gene, *XALI(AGL12)*, regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **146**: 1-12.
- ⁹⁵ 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.
- ⁹⁶ Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC and Colombo L. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *The Plant Cell* **15** (7): 1538-1551.
- ⁹⁷ Martínez-Castilla LP and ER Álvarez-Buylla. (2003). Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *PNAS* **100**: 13407-13412.
- ⁹⁸ Álvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Ribas de Pouplana L, Martínez-Castilla L and Yanofsky MF. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *PNAS* **97**: 5328-5333.
- ⁹⁹ De Bodt S, Raes J, Van de Peer Y and Theissen G. (2003). And then there were many: MADS goes genomic. *Trends in Plant Science* **8**: 475-483.
- ¹⁰⁰ Komeda Y. (2004). Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 521-535.
- ¹⁰¹ Parcy F. (2005). Flowering: a time for integration. *Int J Dev Biol* **49**: 585-593.
- ¹⁰² Álvarez-Buylla ER, Benítez M, Corvera-Poiré A, Chaos Cador A, de Folter S, Gamboa de Buen A, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Pérez-Ruiz RV, Piñeyro-Nelson A and Sánchez-Corrales YE. (2010). Flower development. March 23, 2010. The *Arabidopsis* Book. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists. doi: 10.1199/tab.0127, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- ¹⁰³ Álvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F and Yanofsky MF. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal* **24**: 457-466.
- ¹⁰⁴ Burgeff CNL. (2001). Genes MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*: patrones de expresión *in situ* y análisis filogenético. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 56pp.
- ¹⁰⁵ Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-López R, Yanofsky ME, Álvarez-Buylla ER. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **214**: 365-372.
- ¹⁰⁶ Nawy T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K and Benfey PN. (2005). Transcriptional profile of the *Arabidopsis* root quiescent center. *Plant Cell* **17**: 1908-1925.
- ¹⁰⁷ Davies B, Egea-Cortines M, de Andrade Silva E, Saedler H and Sommer H. (1996). Multiple interactions among floral homeotic MADS box proteins. *EMBO J* **15**: 4330-4343.
- ¹⁰⁸ Fan HY, Hu H, Tudor M and Ma H. (1997). Specific interactions between the K domain of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. *Plant J* **12**: 999-1010.
- ¹⁰⁹ Kaufmann K, Melzer R and Theissen G. (2005). MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* **347**: 183-198.

-
- ¹¹⁰ De Folter S, Immink RG, Kieffer M, Parenicova L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B and Angenent GC. (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *The Plant Cell* **17**: 1424-1433.
- ¹¹¹ Baumann E, Lewald J, Saedler H, Schultz H and Wisman E. (1998). Successful PCR-based reversed genetic screen using an *En-1* mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generated via single-seed descent. *Theor Appl Genet* **97**: 729-734.
- ¹¹² Gan Y., Filleur S., Rahman A., Gotensparre S. and Forde B. G. (2005). Nutritional regulation of *ANRI* and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **222**: 730-742.
- ¹¹³ Han P, García-Ponce B, Fonseca-Salazar G, Álvarez-Buylla ER and Yu H. (2008). *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a *FT*-independent photoperiod pathway. *The Plant Journal* **55**: 253-265.
- ¹¹⁴ Zuo J, Niu Q-W and Chua N-H. (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**: 265-273.
- ¹¹⁵ Fonseca Salazar Gabriel Sinué. (2007). Caracterización del fenotipo radicular de algunos mutantes de los genes MADS-box del clado de *ANRI* de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés por carencia de nitratos y fosfatos. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. pp 112.
- ¹¹⁶ Van Norman JM, Frederick RL and Sieburth LE. (2004). *BYPASS1* negatively regulates a root-derived signal that controls plant architecture. *Curr Biol* **14**: 1739-1746.
- ¹¹⁷ Nelson T. (2004). Plant signaling: notes from the underground. *Curr Biol* **14**: R929-930.
- ¹¹⁸ Zhou K, Yamagishi M, Osaki M and Masuda K. (2008). Sugar signalling mediates cluster root formation and phosphorus starvation-induced gene expression in white lupin. *J Exp Bot* **59**: 2749-2756.
- ¹¹⁹ Engler Jde A, De Veylder L, De Groodt R, Rombauts S, Boudolf V, De Meyer B, Hemerly A, Ferreira P, Beeckman T, Karimi M, Hilson P, Inzé D and Engler G. (2009). Systematic analysis of cell-cycle gene expression during *Arabidopsis* development. *Plant J* **59**: 645-660.
- ¹²⁰ Takahashi I, Kojima S, Sakaguchi N, Umeda-Hara C and Umeda M. (2010). Two *Arabidopsis* cyclin A3 possess G1 cyclin-like features. *Plant Cell Rep* **29**: 307-315.
- ¹²¹ Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ and Bennett M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**: 843-852.
- ¹²² Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H and Schumulling T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**: 2532-2550.
- ¹²³ Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingrom M, Scholkopf B, Weigel D and Lohmann JU. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* **37**: 501-506.
- ¹²⁴ Burssens S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inzé D and Verbruggen N. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 632-640.
- ¹²⁵ Doerner P, Jorgensen JE, You R, Stepphyn J and Lamb C. (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**: 520-523.
- ¹²⁶ Lee J, Das A, Yamaguchi M, Hashimoto J, Tsutsumi N, Uchimiya H and Umeda M. (2003). Cell cycle function of a rice B2-type cyclin interacting with a B-type cyclin-dependent kinase. *Plant J* **34**: 417-425.
- ¹²⁷ Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovski JG and Herrera-Estrella L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**: 174-184.
- ¹²⁸ Qi R and PC John. (2007). Expression of genomic *AtCYCD2;1* in *Arabidopsis* induces cell division at smaller cell sizes: implications for the control of plant growth. *Plant Physiol* **144**: 1587-1597.
- ¹²⁹ Zhang Y, Gu M, Xia X, Shi K, Zhou Y and Yu J. (2009). Effects of phenylcarboxylic acids on mitosis, endoreduplication and expression of cell cycle-related genes in roots of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Chem Ecol* **35**: 679-688.
- ¹³⁰ Saiga S, Furumizu C, Yokoyama R, Kurata T, Sato S, Tabata S, Suzuki M and Komeda Y. (2008). The *Arabidopsis* *OBERON1* and *OBERON2* genes encode plant homeodomain finger proteins and are required for apical meristem maintenance. *Development* **135**: 1751-1759.
- ¹³¹ Casson S A, Topping J F and Lindsey K. (2009). *MERISTEM-DEFECTIVE*, an RS domain protein, is required for the correct meristem patterning and function in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**: 857-869.

- ¹³² Linkhor BI, Williamson LC, Fitter AH and Leyser HM. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* **29**: 751-760.
- ¹³³ Lee J, Oh M, Park H and Lee I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J* **55**: 832-843.
- ¹³⁴ Song CP and Galbraith DW. (2006). AtSAP18, an orthologue of human SAP18, is involved in the regulation of salt stress and mediates transcriptional repression in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **60**: 241-257.
- ¹³⁵ Liu C, Xi W, Shen L, Tan C and Yu H. (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental Cell* **16**: 711-722.
- ¹³⁶ Amasino R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J* **65**: 1001-1013.
- ¹³⁷ Turck F, Fornara F and Coupland G. (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 573-594.
- ¹³⁸ Lagercrantz U. (2009). At the end of the day: a common molecular mechanism for photoperiod responses in plants? *J Exp Bot* **60**: 2501-2515.
- ¹³⁹ 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**: 847-857.
- ¹⁴⁰ Imaizumi T. (2010). *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodisms: time to think about location. *Curr Op Plant Biol* **13**: 83-89.
- ¹⁴¹ Devlin PF and SA Kay. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *The Plant Cell* **12**: 2499-2509.
- ¹⁴² Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA and Coupland G. (2009). *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev Cell* **17**: 75-86.
- ¹⁴³ Nakamichi N, Kita M, Niimura K, Ito S, Yamashita T, Mizoguchi T and Mizuno T. (2007). *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiol* **48**: 822-832.
- ¹⁴⁴ Sawa M, Nusinow DA, Kay SA and Imaizumi T. (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for a day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* **318**: 261-265.
- ¹⁴⁵ Yu JW, Rubio V, Lee NY, Bai S, Lee SY, Kim SS, Liu L, Zhang Y, Irigoyen ML and Sullivan JA. (2008). COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Mol Cell* **32**: 617-630.
- ¹⁴⁶ Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F and Coupland G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 1116-1120.
- ¹⁴⁷ Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A and Coupland G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003-1006.
- ¹⁴⁸ Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF and Coupland G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* **288**: 1613-1616.
- ¹⁴⁹ An H, Roussot C, Suárez-López P, Corbesier L, Vincent C, *et al.* (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* **131**: 3615-3626.
- ¹⁵⁰ Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C and Coupland G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **316**: 1030-1033.
- ¹⁵¹ Klejnot J and C Lin. (2004). A CONSTANS experience brought to light. *Science* **303**: 965-966.
- ¹⁵² Laubinger S, Marchal V, Gentilhomme J, Wenkel S, Adrian J, Jang S, Kulajta C, Braun H, Coupland G and Hoecker U. (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* **133**: 3213-3222.
- ¹⁵³ Jang S, Marchal V, Panigrahi KC, Wenkel S, Soppe W, Deng XW, Valverde F and Coupland G. (2008). *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J* **27**: 1277-1288.
- ¹⁵⁴ Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU and Weigel D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 1056-1059.

-
- ¹⁵⁵ Mathieu J, Warthmann N, Kuttner F and Schmid M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **17**: 1155-1160.
- ¹⁵⁶ 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**: 1052-1056.
- ¹⁵⁷ Yoo SK, Chung KS, Kim J, Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Yoo SY, Lee JS and Ahn JH. (2005). CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 770-778.
- ¹⁵⁸ Teper-Bamnolker P and A Samach. (2005). The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* **17**: 2661-2675.
- ¹⁵⁹ Ruiz-García L, Madueño F, Wilkinson M, Haughn G, Salinas J and Martínez-Zapater JM. (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 1921-1934.
- ¹⁶⁰ Liljegren SJ, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta GS and Yanofsky MF. (1999). Interactions among APETALA1, LEAFY and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell* **11**: 1007-1018.
- ¹⁶¹ Liu C, Chen H, Er HL, Soo HM, Kumar PP, Han JH, Liou YC and Yu H. (2008). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development* **135**: 1481-1491.