



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

PARTICIPACIÓN DE LOS GENES *AGL24*, *SOC1* Y *XAL2*
EN EL DESARROLLO DE LA RAÍZ PRIMARIA DE
Arabidopsis thaliana EN CONDICIONES
DE ESTRÉS OSMÓTICO

NATALIA CASTELÁN MUÑOZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Natalia Castelán Muñoz, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Carlos Trejo López, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis PARTICIPACIÓN DE LOS GENES AGL24, SOC1 Y XAL2 EN EL DESARROLLO DE LA RAÍZ PRIMARIA DE Arabidopsis thaliana EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 13 de noviembre de 2019

Firma del
Alumno (a)

Carlos Trejo López

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada “PARTICIPACIÓN DE LOS GENES *AGL24*, *SOC1* Y *XAL2* EN EL DESARROLLO DE LA RAÍZ PRIMARIA DE *Arabidopsis thaliana* EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO”, realizada por la alumna Natalia Castelán Muñoz, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO Carlos Trejo L.
Dr. Carlos Trejo López

Directora de Tesis Adriana Garay A.
Dra. Adriana Garay Arroyo

ASESORA María Elena Álvarez-Buylla Rocés
Dra. María Elena Álvarez-Buylla Rocés

ASESORA Hilda Araceli Zavaleta Mancera
Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera

ASESORA Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

ASESORA Libia Iris Trejo Téllez
Dra. Libia Iris Trejo Téllez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2019

PARTICIPACIÓN DE LOS GENES *AGL24*, *SOC1* Y *XAL2* EN EL DESARROLLO DE LA RAÍZ PRIMARIA DE *Arabidopsis thaliana* EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO

**Natalia Castelán Muñoz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2019**

RESUMEN

El crecimiento de la raíz primaria está modulado por los procesos de proliferación y elongación localizados espacialmente en el meristemo apical de la raíz y la zona de elongación. Las tasas de proliferación y diferenciación celular son dos procesos íntimamente ligados y su proporción se modifica en respuesta a estímulos tanto internos como externos. Los procesos moleculares dirigidos por los patrones de expresión genética implicados en el crecimiento de la raíz están determinados por la combinación de reguladores transcripcionales que integran tanto las señales hormonales como las señales externas. Los factores de transcripción del dominio-MADS son conocidos por su función de reguladores de la expresión genética en los procesos del desarrollo, actuando a través de complejos multiméricos de los mismos miembros de la familia. En esta investigación, caracterizamos la participación de los genes, conocidos como integradores de las vías de floración, *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) en el desarrollo de la raíz primaria de plántulas, de 5-11 días de edad, de *Arabidopsis thaliana*, y su interacción genética con *XAANTAL 2 / AGAMOUS-LIKE 14* (*XAL2/AGL14*), un promotor del crecimiento de la raíz cuya función ha sido parcialmente establecida en un trabajo previo. En el presente estudio, las cinéticas de crecimiento de la raíz primaria y los análisis de la longitud celular de la zona meristemática, elongación y maduración de mutantes de pérdida de función *xal2-2*, *agl24-4* y *soc1-6* y mutantes dobles de *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* mostraron que tanto *SOC1* como *AGL24*, participan en el desarrollo de la raíz primaria regulando el crecimiento de manera negativa, como represores, de forma opuesta de *XAL2*. Demostramos que *SOC1* es suficiente para inhibir levemente la elongación celular (11-33% en la zona de elongación); mientras que, en la modulación de la proliferación celular, *SOC1* está por abajo de *XAL2*. A su vez, *xal2-2* es epistático a *agl24-4* sobre el control del tamaño del meristemo; y *AGL24* también inhibe la elongación celular de forma opuesta a *XAL2*; no obstante, esto solo fue observado en ausencia de la actividad de *XAL2*. El efecto de *SOC1* y *AGL24* opuesto al de *XAL2* permiten un balance y compensan parcialmente en el crecimiento de la raíz primaria en condiciones óptimas de crecimiento. Lo anterior, contrasta con la función redundante de *XAL2* con *AGL24* y *SOC1* observada en la parte aérea durante la transición a la floración, reportada en la literatura. Además, en esta investigación encontramos que, los genes *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* participan en la modulación de la longitud de la raíz

primaria en respuesta a estrés osmótico severo ($\Psi_0 = -0.85$ MPa). De manera interesante, en estrés osmótico, la interacción entre los genes *XAL2* y *AGL24* se modifica: *XAL2* regula positivamente a *AGL24* tanto en la producción celular como en la elongación. El análisis de la longitud de la raíz primaria en concentraciones de ácido abscísico inhibitorias y estimulantes del crecimiento evidenció que se requiere del efecto de los genes *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* durante los mecanismos de regulación del crecimiento de la raíz dependientes de ácido abscísico. Finalmente, el análisis de cambios en la abundancia de proteínas del ápice de la raíz primaria en geles de electroforesis 2D (SDS-PAGE), y la identificación de las proteínas por espectrometría de masas, reveló que *XAL2* afecta la abundancia de la proteína GSTF9 que es importante para la homeostasis redox. Lo anterior sugiere que *GSTF9* posiblemente es un componente en la red de regulación del crecimiento de la raíz en la que participa *XAL2*, y que *XAL2* está involucrado en la regulación de la homeostasis redox. Estos resultados son novedosos e inesperados porque la función de *AGL24* y *SOCI* está ampliamente asociada a la transición de la floración en la parte aérea de la planta y para nada se había pensado que estos interactuaran con genes que claramente están involucrados en el crecimiento de la raíz. Por lo cual nuestros hallazgos amplían el conocimiento sobre el alcance funcional de estos reguladores del desarrollo.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, genes MADS-box, *XAL2*, *AGL24*, *SOCI*, raíz primaria, meristemo apical de la raíz, estrés osmótico, ácido abscísico, GSTF9.

PARTICIPATION OF *AGL24*, *SOC1* AND *XAL2* GENES IN THE PRIMARY ROOT DEVELOPMENT OF *Arabidopsis thaliana* IN OSMOTIC STRESS CONDITIONS

Natalia Castelán Muñoz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Primary root growth is modulated by proliferation and elongation processes in the root apical meristem and elongation zone. Cell proliferation and differentiation are two intimately linked processes and their rates are modified in response to both internal and external stimuli. Molecular processes are driven by the expression patterns of genes involved in root growth, which are determined by a combination of transcriptional regulators that integrate external signals, such as hormones. The MADS-domain transcription factors, known for their role as regulators of genetic expression in developmental processes, act through multimeric complexes of the same family members. In this work, we characterized the participation of the *AGAMOUS-LIKE 24* (*AGL24*) and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) genes, which are known flowering pathway integrators, in the development of the primary roots of, 5-11 day old, *Arabidopsis thaliana* seedlings, and their genetic interaction with *XAANTAL 2 / AGAMOUS-LIKE 14* (*XAL2/AGL14*), a primary root growth promoter whose function was partially established in previous work. In the present work, the kinetics of primary root growth and an analysis of cell length in the root apical meristem, elongation zone and maturation zone of the loss of function single mutants *xal2-2*, *agl24-4* and *soc1-6*, and double mutants *xal2-2 agl24-4* and *xal2-2 soc1-6* showed that both *SOC1* and *AGL24*, are involved in primary root development by negatively regulating growth, as repressors, in contrast to *XAL2*. We show that *SOC1* mutation is sufficient to slightly inhibit cell elongation (11-33% at the elongation zone); while the modulation effect of *SOC1* mutation on cell proliferation is less pronounced than that of *XAL2*. In turn, *xal2-2* was found to be epistatic to *agl24-4* for the control of meristem size; and *AGL24* mutation inhibited cellular elongation, unlike *XAL2* mutation; however, this finding was observed only in the absence of *XAL2* activity. The opposing effects of *SOC1* and *AGL24* versus *XAL2* are balanced and partially compensate for primary root growth under optimal growing conditions. This finding contrasts with the redundant functions of *XAL2* versus *AGL24* and *SOC1* observed in the shoot during the transition to flowering, as reported in the literature. However, in this work we find that, the effects of *AGL24*, *SOC1* and *XAL2* were required to modulate

the length of the primary root in response to severe osmotic stress ($\Psi_o = -0.85$ MPa). Interestingly, under osmotic stress, the interaction between *XAL2* and *AGL24* changed: *XAL2* positively regulated *AGL24* in terms of both cell production and elongation. Likewise, analysis of the primary root length under treatment with abscisic acid at inhibitory and growth-stimulating concentrations showed that the effects of *AGL24*, *SOC1* and *XAL2* are required for the mechanisms of abscisic acid-dependent root growth regulation. Finally, analysis of changes in the protein abundance at the apex (1 cm) of the primary root by gel electrophoresis 2D (SDS-PAGE), and protein identification by mass spectrometry revealed that, *XAL2* affected the abundance of the GSTF9 protein, which is important for redox homeostasis. This finding suggests that GSTF9 is a component of the root growth regulatory network in which *XAL2* participates, and that *XAL2* is involved in the regulation of redox homeostasis. These results are novel and unexpected because the functions of *AGL24* and *SOC1* are widely associated with the transition from flowering in the shoot and *AGL24* and *SOC1* had not been thought to interact with genes clearly involved in the root growth. Therefore, our findings extend knowledge of the functional scope of these development regulators.

KEY WORDS: *Arabidopsis thaliana*, MADS-box, *XAL2*, *AGL24*, *SOC1*, primary root, root apical meristem, osmotic stress, abscisic acid, GSTF9.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados (ColPos) por los apoyos para investigación y asistencia a congresos que me brindó. A CONACYT por otorgarme la beca que me permitió realizar los estudios de Doctorado en Ciencias.

Así mismo, agradezco al Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas, del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (IE-UNAM), donde realicé esta investigación; por todo el apoyo otorgado, tanto en la infraestructura, en los insumos necesarios, en la cobertura de los costos de la publicación del artículo y asistencia a congresos.

De la misma manera, agradezco el financiamiento que otorgaron los proyectos: UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN204217, IN211516, IN208517; ERA-B CONACYT: 240180 y 2015-01-687.

Agradezco al pueblo de México que ha mantenido la educación pública, y que a través de las instituciones antes mencionadas financió mis estudios.

En la realización de este trabajo colaboraron muchísimas personas, por ello reconozco ante todo su disposición para apoyarme. Mi más sincero agradecimiento:

A la Directora de esta tesis, la Dra. Adriana Garay Arroyo, por brindarme un espacio y todas las facilidades en su laboratorio; por ofrecerme un proyecto que permitió iniciarme en el estudio de la genética molecular del estrés osmótico y el desarrollo; por todo el apoyo académico otorgado.

A mi Consejero Particular, el Dr. Carlos Trejo López (ColPos), por estar siempre al tanto de mí y alentarme durante todo momento; además, por las pláticas sobre estrés hídrico.

A la Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces (IE-UNAM), la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera (ColPos), la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles (Instituto de Biotecnología-UNAM), y la Dra. Libia Iris Trejo Téllez (ColPos), por aceptar ser parte de mi Consejo Particular, por sus comentarios y aportaciones a este trabajo, y por su asistencia a las Reuniones de Consejo aún en lugares lejanos a su institución. Además, agradezco al Dr. F. Víctor Conde Martínez por aceptar ser sinodal, y por sus comentarios sobre este escrito.

Al Dr. Jorge Herrera Díaz de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), de la Facultad de Química-UNAM, por enseñarme el método de electroforesis en gel de poliacrilamida 2D y la medición de la abundancia de proteínas. También a la QFB Margarita Guzmán Villanueva, del USAI, por realizar la identificación de proteínas por Espectrometría de Masas para esta tesis. Al Dr. Vadim Pérez del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada, del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, por la asistencia en la microscopía confocal. A la Dra. Yamel Ugartechea Chirino por la asistencia inicial en la microscopía de interferencia de contraste diferencial.

A todas las integrantes del Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas IE-UNAM: la Dra. Berenice García Ponce, la Dra. María de la Paz Sánchez por el apoyo durante mi estancia en el laboratorio y sus correcciones al artículo; a las laboratoristas Laura Rodríguez y la Dra. María Teresa Romero por su asistencia en lo experimental y por sus palabras de aliento; a Diana Romo en la logística administrativa, y a la técnica Dra. Diana Belén Sánchez Rodríguez.

A todas mis compañeras de laboratorio por apoyarme en lo experimental, lo académico y lo emocional desde el primer día, por generar un ambiente de trabajo tan agradable; por las experiencias y los métodos compartidos; y por supuesto, por su amistad, principalmente a la M.C. Estephania Zluhan Martínez, a la M.C. Wendy Cajero Sánchez, al M.C. Joel Herrera Martínez y a la Dra. Verónica Jiménez Suárez.

A la M.C. Ana Bertha Galicia, del Laboratorio de Fisiología Vegetal, Ambiental y Biofísica (ColPos), por su apoyo durante la medición del potencial osmótico.

A mi colega del posgrado, la M.C. Marlen Guadalupe Hidalgo Sánchez (ColPos) por su amistad, las pláticas de fisiología, y el apoyo en varios trámites del ColPos durante mi estancia en el IE-UNAM.

A mis padres Julio Castelán y Raquel Muñoz, y a mi hermano Edy por el amor y el apoyo infinitos, por estar siempre presentes alentándome. Además, a Raquel Muñoz por la revisión final de este escrito para detectar “errores de dedo”. A mi pareja, Carlos M2, por todo el amor y el soporte emocional en este proceso; y también por acompañarme en casa trabajando o al IE en bici los fines de semana, cuando fue necesario.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio del desarrollo.....	1
1.3. Factores de transcripción con dominio-MADS.....	3
1.4. Función de <i>XAL2</i> y su interacción con <i>AGL24</i> y <i>SOC1</i> en la parte aérea de <i>Arabidopsis</i>	6
1.5. Efectos del estrés osmótico en el crecimiento de la raíz primaria.....	9
1.6. El papel del ácido abscísico en la regulación del desarrollo de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	15
1.7. Participación de <i>AGL24</i> , <i>SOC1</i> y <i>XAL2</i> en la regulación del estrés abiótico.....	18
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
2.1. HIPÓTESIS.....	20
2.2. OBJETIVOS.....	21
2.2.1. Objetivo general.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Material vegetal.....	22
3.1.1. Genotipificación.....	22
3.2. Producción de semillas y condiciones de crecimiento inicial.....	23
3.3. Tratamientos.....	23
3.3.1. Inducción de estrés osmótico.....	23
3.3.2. Tratamientos con ácido abscísico y fluridona.....	23
3.4. Variables evaluadas.....	24
3.4.1. Medición del Potencial osmótico (Ψ_o).....	24
3.4.2. Evaluación del crecimiento en longitud de la raíz primaria.....	24
3.4.3. Análisis celular de las zonas de crecimiento de la raíz primaria.....	24
3.4.4. Análisis de la abundancia de proteínas.....	25
3.4.4.1. Extracción de proteínas totales.....	25
3.4.4.2. Cuantificación de las proteínas extraídas.....	25
3.4.4.3. Isoelectroenfoque de proteínas totales.....	26
3.4.4.4. Electroforesis 2D SDS-PAGE.....	26

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. Comparación de los perfiles de expresión transcripcional de <i>AGL24</i> , <i>SOCI</i> y <i>XAL2</i> en la raíz de <i>Arabidopsis</i>	28
4.2. Caracterización del crecimiento de la raíz primaria de <i>AGL24</i> y <i>SOCI</i> , y su interacción genética con <i>XAL2</i> en respuesta al estrés osmótico	29
4.2.1. Longitud de la raíz primaria	29
4.2.2. Bases celulares de la función de <i>SOCI</i> , <i>AGL24</i> y <i>XAL2</i> en la zona de crecimiento de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	37
4.3. Modulación del crecimiento de la raíz mediado por ácido abscísico (ABA).	53
4.4. Análisis del patrón de expresión de proteínas en 2D SDS-PAGE.....	62
5. CONCLUSIONES	70
ANEXO.....	90

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de las líneas genéticas.....	22
Cuadro 2. Longitud de las células corticales completamente elongadas, tasa de producción celular y tasa de crecimiento de la raíz primaria	45
Cuadro 3. Proteínas identificadas.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la estructura de los alelos empleados (barra de escala= 200 pb). Los intrones están representados por líneas y los exones por rectángulos.....	22
Figura 2. Los patrones de expresión de <i>SOC1</i> y <i>AGL24</i> concuerdan con los de <i>XAL2</i> en las diferentes zonas de crecimiento de la raíz primaria	29
Figura 3. <i>AGL24</i> y <i>SOC1</i> son represores del crecimiento de la raíz, actuando de manera opuesta a <i>XAL2</i> . Longitud de la raíz primaria (cm) de plántulas de <i>Arabidopsis</i> con pérdida de función de los diferentes alelos de los genes MADS-box señalados. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps (días post siembra) a medio MS (0.2X) A) control o B) con manitol (300 mM), para su crecimiento durante un período de 6 días.....	31
Figura 4. La mutación doble de <i>XAL2</i> y <i>AGL24</i> causa un incremento en la sensibilidad a la sequía en la raíz primaria comparado con la mutación sencilla de cada gen. (A) Plántulas de <i>Arabidopsis</i> y (B) longitud de la raíz primaria (cm) a seis días de tratamiento con manitol 300 mM.....	32
Figura 5. Disminución por efecto del estrés osmótico en el tamaño de los dominios del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz primaria de plántulas tipo silvestre (Col-0) de <i>Arabidopsis</i> . Microscopía óptica de interferencia de contraste diferencial (DIC) del ápice de la raíz primaria.....	39
Figura 6. Longitud de las células corticales a partir del centro quiescente y hasta diez células del primer pelo radical de plántulas de <i>Arabidopsis</i> de los genotipos indicados, sometidas al tratamiento control (MS 0.2X) o de estrés osmótico (0.2X MS adicionado con 300 mM Manitol) en dos diferentes tiempos 24 h y 48 h	40
Figura 7. Cambios en el tamaño de los dominios del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz primaria en respuesta a estrés osmótico.....	41
Figura 8. Longitud de la zona de crecimiento de la raíz primaria conformada por el meristemo apical (dominio de proliferación más dominio de transición) y la zona de elongación	44
Figura 9. A) Número de células en el dominio de proliferación y en el dominio de transición. B) Longitud crítica de las células en que transitan del dominio de proliferación al dominio de transición. C) Longitud crítica de las células que transitan del dominio de transición a la zona de elongación.....	46
Figura 10. Inhibición causada por el estrés osmótico en las diferentes zonas de crecimiento de la raíz primaria, a las 24 h y 48 h, por genotipo.	47

Figura 11. Efecto de un gradiente de concentraciones de ABA exógeno en la disminución del crecimiento de la raíz primaria de Arabidopsis. A) Plántulas tipo silvestre a los 6 dpt (días post trasplante). B) Longitud de la raíz primaria de plántulas tipo silvestre a los 6 dpt en diferentes concentraciones de ABA	54
Figura 12. Las mutantes dobles <i>xal2-2 agl24-4</i> como los parentales <i>agl24-4</i> y <i>xal2-2</i> son significativamente menos sensibles al efecto inhibitorio de ABA 10 μ M en el crecimiento de la raíz primaria.	56
Figura 13. A diferencia de las plántulas tipo silvestre Col-0, <i>xal2-2</i> y las mutantes dobles <i>xal2-2 agl24-4</i> , <i>xal2-2 soc1-6</i> no presentaron una estimulación significativa por el efecto de ABA 0.1 μ M.	58
Figura 14. Las mutantes de <i>agl24-4</i> fueron más sensibles a la inhibición por fluridona. Longitud de la raíz primaria (cm) de plántulas de Arabidopsis a 6 días de tratamiento con fluridona 0.1 μ M	60
Figura 15. SDS-PAGE 1D de verificación de integridad y cuantificación de la concentración de las proteínas extraídas (4 μ g) de 1 cm del ápice de la raíz primaria de los diferentes genotipos	63
Figura 16. <i>XAL2</i> es necesario para la expresión normal de una gran cantidad de proteínas en el ápice de la raíz primaria de Arabidopsis. Patrón de expresión de proteínas 2D SDS-PAGE del 1 ^{er} cm apical de la raíz primaria de plántulas de Arabidopsis, con 6 dps, de los genotipos Col-0, <i>xal2-2</i> , <i>agl24-4</i> , <i>soc1-6</i> , <i>xal2-2 agl24-4</i> y <i>xal2-2 soc1-6</i>	64
Figura 17. Ampliación de la imagen de las proteínas del gel 2D SDS-PAGE del 1 ^{er} cm apical de la raíz primaria de plántulas de Arabidopsis con 6 dps, de los genotipos Col-0, <i>xal2-2 agl24-4 soc1-6</i> , <i>agl24-4</i> y <i>xal2-2 soc1-6</i> de la Figura 16.	66
Figura A 1. A) Longitud del meristemo apical de la raíz primaria (RAM). B) Longitud de la zona de elongación.....	90
Figura A 2. A) Longitud del dominio de proliferación. B) Longitud del dominio de transición	91
Figura A 3. A) Tamaño crítico de las células que transitan del dominio de proliferación al dominio de transición. B) Tamaño crítico de las células que transitan del dominio de transición a la zona de elongación	92
Figura A 4. A) Número de células en el meristemo apical de la raíz primaria. B) Número de células en el dominio de proliferación. C) Número de células en el dominio de transición.	93

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana (*Arabidopsis* de aquí en adelante) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia Brassicaceae. *Arabidopsis* se distribuye en las regiones templadas de Europa, Asia y África del Norte, y ha sido ampliamente introducida en otras regiones del Norte de América y Australia (Anderson y Wilson, 2000). Es una planta herbácea de tamaño pequeño, con un ciclo de vida corto que tarda de seis a ocho semanas en completarse. Además, debido a que *Arabidopsis* en el estadio de esporofito es diploide, a que su fecundación se realiza por autopolinización, y a que genera una gran cantidad de semillas, en pocas generaciones es posible obtener poblaciones homocigotas (Wilson, 2000). Estas características hacen de *Arabidopsis* una especie fácilmente cultivable y manipulable genéticamente, por lo que fue adoptada como planta modelo de estudio de genética, biología molecular y evolución del desarrollo. Aunado a esto, la secuenciación de su genoma completo, relativamente pequeño, que consta de 125 millones de pares de bases, y los bancos de semillas comerciales con mutantes disponibles de casi todos los genes han sido herramientas cruciales para el entendimiento de la organización y regulación genética de los complejos procesos del desarrollo vegetal (Bolger et al., 2019; Nath et al., 2005; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

1.2. La raíz de *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio del desarrollo

El sistema radical es un órgano importante para las plantas, no solo como estructura de anclaje y soporte en el suelo, sino que también es responsable de la absorción de agua y nutrientes minerales. Además, la raíz es altamente perceptiva de los cambios del medio en el que se desarrolla, ante los cuales responde de manera plástica, modulando los procesos de proliferación y diferenciación, y con ello pudiendo modificar su arquitectura (Yu et al., 2014b). El meristemo apical de la raíz (o RAM, por sus siglas en inglés: “Root Apical Meristem”) de *Arabidopsis* tiene un crecimiento indeterminado, el cual provee de células a todos los tipos celulares de la raíz. Las células transitan a la zona de elongación en donde dejan de duplicarse y luego a la zona de diferenciación en donde se diferencian y maduran: por ejemplo, las células de la epidermis forman los pelos radicales de (Montiel et al., 2004).

El pro-meristemo de la raíz primaria se establece durante la embriogénesis, a partir de la división asimétrica del cigoto. Una división sucesiva en la hilera inferior del embrión forma el suspensor, cuya célula basal, la hipófisis, da origen a las iniciales de columela y al centro quiescente (Dolan et al., 1993). A partir de células del embrión también se desarrollan los grupos de las iniciales de los tipos celulares

restantes, cuya organización radial se establece desde el embrión y se mantiene después de la etapa embrionaria. El centro quiescente junto con las células iniciales forman el nicho de células madre o nicho de células troncales (Yang et al., 2014). El centro quiescente es el llamado organizador central en otros organismos; en *Arabidopsis* consta de un grupo de cuatro células que actúa como un reservorio a largo plazo de las células iniciales circundantes, manteniéndose en un estado no diferenciado, pluripotente y con una división muy lenta (Drisch y Stahl, 2015). Esta relativa inactividad de centro quiescente es indispensable para el desarrollo continuo de la raíz (Ortega-Martínez et al., 2007; Sarkar et al., 2007).

Las células iniciales, que en *Arabidopsis* forman cuatro grupos, dan lugar a los siguientes tejidos de la raíz: 1) el cilindro vascular, 2) la columela, 3) la corteza y la endodermis y 4) la epidermis y la cofia lateral. Las células derivadas de las iniciales se diferencian estrictamente de acuerdo con sus posiciones en tejidos, resultando en patrones celulares / tisulares bien definidos y altamente predecibles (Scheres et al., 2002). En cuanto a la organización concéntrica, los linajes de células que se encuentran en la raíz son, de afuera hacia adentro, la epidermis, el córtex, la endodermis, el periciclo y el cilindro vascular. Estos tipos celulares de la raíz de *Arabidopsis* son fácilmente distinguibles y presentan un número de células altamente conservado (Rahni y Birnbaum, 2019).

Las células derivadas de las células iniciales transitan longitudinalmente y sucesivamente por tres diferentes zonas de la raíz que se diferencian por sus tasas de división celular, de elongación y de maduración: a) la zona meristemática, que se localiza en el ápice de la raíz, comprende el dominio de proliferación (DP) donde las células se duplican, y el dominio de transición (DT) en el cual las células presentan menos células dividiéndose, aunque la duración del ciclo celular es la misma que en las células que están en el dominio de proliferación y comienzan a alargarse; b) la zona de elongación (ZE) formada por las células provenientes del meristemo que dejan de dividirse y se elongan a una mayor velocidad; y c) la zona de diferenciación (ZD), en donde las células adquieren su tamaño y función final al diferenciarse en varios tipos celulares, es fácilmente distinguible por la aparición de pelos radicales (Cajero-Sánchez et al., 2018; Ivanov y Dubrovsky, 2013)

Debido a la presencia de pocos tipos celulares y al número conservado de células por cada hilera de los mismos, el crecimiento de la raíz primaria puede ser analizado usando una sola fila de células que es representativa del resto de los tipos celulares (Beemster, 2002; Beemster y Baskin, 1998). Así, cualquier desviación significativa del patrón estándar de organización entre genotipos o debido a una respuesta a las señales del ambiente, puede ser detectada (Ivanov y Dubrovsky, 2013; Pacheco-Escobedo et al., 2016). Por lo anterior, la raíz de *Arabidopsis* se ha utilizado como un modelo para estudios de

desarrollo y de los mecanismos moleculares que lo controlan (Bennett y Scheres, 2010; Dolan et al., 1993; Garay-Arroyo et al., 2013; Pacheco-Escobedo et al., 2016; Tapia-López et al., 2008).

1.3. Factores de transcripción con dominio-MADS

Para que se lleven a cabo los diferentes procesos morfogénicos que determinan el desarrollo de un organismo, es necesaria la regulación dinámica de módulos genéticos en coordinación con las señales internas, i.e. hormonas y moléculas señalizadoras, que integran las señales ambientales. Los factores de transcripción son proteínas que reconocen y se unen al ADN en una secuencia específica de sus genes blanco para regular su expresión mediante activación o represión (Herath, 2018). Aproximadamente el 5% de los genes que conforman el genoma de *Arabidopsis* codifican para factores de transcripción, los cuales han sido clasificados en diferentes familias con base en la estructura de su dominio de unión al ADN (Gonzalez, 2016; Riechmann y Ratcliffe, 2000).

La familia de genes MADS-box codifica para una gran variedad de factores de transcripción involucrados en la regulación de diversos procesos del desarrollo en hongos, plantas y animales (Kaufmann et al., 2005; Riechmann et al., 1996; Theißen y Gramzow, 2016). En 1990, Schwarz-Sommer et al., acuñaron el nombre de esta familia con el acrónimo formado a partir de la inicial de los primeros cuatro genes MADS-box caracterizados en diferentes organismos: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE FACTOR 1 (MCM1)* de *Saccharomyces cerevisiae* (Passmore et al., 1988), *AGAMOUS (AG)* de *Arabidopsis* (Yanofsky et al., 1990) *DEFICIENS (DEF)* de *Antirrhinum majus* (Sommer et al., 1990) y *SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)* de *Homo sapiens* (Norman et al., 1988).

El motivo distintivo de estos factores de transcripción es el dominio-MADS, que es la región más conservada de la proteína, localizada en la región N-terminal y consta de ~56 aminoácidos (Rounsley et al., 1995). Mediante este dominio, las proteínas con dominio-MADS se unen a secuencias específicas del DNA, conocidas como cajas CA_nG [5'-CC(A/T)_nGG-3'], que actúan como elementos de regulación en *cis* en los promotores o regiones reguladoras de los genes blanco (Hayes et al., 1988; Mohun et al., 1987). Adicionalmente, el dominio MADS participa en la localización nuclear (McGonigle et al., 1996) y en la dimerización con otros miembros de la familia con dominio-MADS (Immink et al., 2002; McGonigle et al., 1996; Treisman, 1995).

Las proteínas de esta familia son estructuralmente diversas. Por medio de análisis filogenético usando la secuencia del dominio MADS, se han categorizado en dos grandes linajes: de Tipo I (MADS SRF-like) y de Tipo II (MEF2-like). Ambos linajes están presentes en todos los eucariotas, así que se asume que fueron originados por duplicación antes de la divergencia entre plantas, animales y hongos.

No obstante, en plantas, estos linajes se pueden distinguir por la ausencia o presencia del dominio keratin-like (K), respectivamente; lo cual sugiere que este dominio evolucionó después de que las proteínas Tipo II divergieron de las proteínas de Tipo I (Álvarez-Buylla et al., 2000b)

Por un lado, las proteínas Tipo-I o Tipo-M solo tienen en común su dominio MADS (M), que usualmente está formado por uno o dos exones, y han sido clasificadas en tres subfamilias $M\alpha$, $M\beta$ y $M\gamma$, con base en la variación de los motivos conservados en la región C-terminal (Nam et al., 2004; Pařenicová et al., 2003). Por otro lado, el linaje Tipo-II o Tipo-MIKC, que ha sido mucho mejor caracterizado que el linaje Tipo-I, tiene una estructura modular con cuatro dominios: el MADS (M), el Intervening (I), el Keratin-like (K) y el dominio carboxilo terminal (C-terminal) (Theißen y Kim, 1996). El linaje Tipo-II ha sido subdividido con base en la divergencia estructural de sus dos dominios I y K, en lo que se conoce como las proteínas $MIKC^C$ (canónicas) y las $MIKC^*$ (Henschel et al., 2002; Leseberg et al., 2006). En la estructura de las proteínas Tipo $MIKC^C$, el dominio I es relativamente variable, está formado por aproximadamente 30 aminoácidos, y contribuye a la especificidad de la unión al DNA y en la formación selectiva de los dímeros proteicos. El dominio K, formado por alrededor de 70 aminoácidos, es el dominio más conservado; tiene una estructura característica de tres hélices anfipáticas superenrolladas que facilitan la formación de dímeros y de complejos multiméricos (Fan et al., 1997; Puranik et al., 2014). Las proteínas $MIKC^*$ presentan una estructura alterada los dominios que se debe a la duplicación de exones que codifican una subregión del dominio K (Smaczniak et al., 2012a). Finalmente, el dominio C-terminal es el dominio más variable en longitud y secuencia; consiste principalmente en aminoácidos hidrofóbicos y tiene diversas funciones, como es la activación transcripcional (Cho et al., 1999) y la formación de complejos multiméricos (Kaufmann et al., 2005; Pařenicová et al., 2003; Riechmann et al., 1996).

Con base en la diversidad en la secuencia del dominio C-terminal, los MADS-box Tipo- $MICK^C$ se han dividido en 13 diferentes subfamilias cuyo nombre hace referencia a la primera proteína identificada: *AG-*, *AGL2-*, *AGL6-*, *AGL12-*, *AGL15-*, *AGL17-*, *DEF-*, *FLC-*, *GGM13-(Bsister)*, *GLO SQUA-*, *SVP -*, y *SOC1/TM3-like* (Smaczniak et al., 2012a; Theißen et al., 1996). Los miembros de las subfamilias son generalmente genes ortólogos altamente conservados. Éstos surgieron en un ancestro común de la especie o son parálogos jóvenes que surgieron más recientemente, por duplicación de genes en uno solo de los descendientes de ancestro común. Por lo tanto, la evolución de la familia de genes MADS-box estuvo dominada por la duplicación de genes y los eventos de especiación. Algunas de las subfamilias podrían haberse originado hace más de 1,000 millones de años (Theißen et al., 1996). Dentro

de la misma subfamilia, los miembros tienden a compartir patrones de expresión similares y funciones altamente relacionadas (Theißen et al., 1996; Zahn et al., 2006).

Para regular la transcripción de sus genes blanco, las proteínas con dominio-MADS se unen al DNA como homo o heterodímeros, y tetrámeros para llevar a cabo su actividad transcripcional (Melzer y Theißen, 2009; Theißen et al., 2016). Además de interactuar de manera combinatoria entre sí, las proteínas con dominio-MADS forman complejos multiméricos con factores de transcripción de otras familias y con otros tipos de reguladores transcripcionales como son los cofactores, los correpresores o los factores remodeladores de la cromatina (Smaczniak et al., 2012a) entre otros. De tal forma, la función específica de las proteínas de dominio-MADS está determinada no solo por secuencias dentro del dominio MADS, que da especificidad a la unión al ADN, sino también por las secuencias dentro de otros dominios, que pueden afectar la interacción con las proteínas asociadas (Kaufmann et al., 2005, 2009; Smaczniak et al., 2012b).

En el genoma de *Arabidopsis* hay 108 genes que codifican proteínas con dominio-MADS (Theißen, 1996; Theißen y Gramzow, 2016). Estos genes se expresan en varios órganos y tejidos vegetativos como el polen, el endospermo, las células guarda, los tricomas y la raíz (Álvarez-Buylla et al., 2000; Arora et al., 2007) y están involucrados predominantemente en procesos de desarrollo llevando a cabo múltiples funciones como la transición a la floración, la formación de los órganos florales, el desarrollo de raíz, en la formación y maduración del fruto, etc. (Fang y Fernández, 2002; Lohmann et al., 2002; Mao et al., 2000; Mouradov et al., 2002; Parenicová et al., 2003; Vrebalov et al., 2002). Además, estudios a gran escala de los perfiles de expresión genética en diferentes especies vegetales han revelado que los genes MADS-box se expresan de manera diferente en diversos tejidos, lo que indica que pueden ejercer diferentes funciones a lo largo de su ciclo de vida (Wei et al., 2018). Los genes MADS-box mejor estudiados son los involucrados en la regulación de características reproductivas, como son: la transición del estadio vegetativo al reproductivo que ocurre en el meristemo apical del tallo y la especificación de la identidad de los órganos de la flor (De Veylder et al., 2001; Liljegren et al., 2000; Nesi et al., 2002; Samach et al., 2000; Yanofsky et al., 1990).

Los genes MADS-box también participan en el desarrollo del sistema radical; sin embargo, su función en este órgano ha sido poco estudiada. Se sabe que, al menos 50 genes MADS-box se expresan en la raíz de *Arabidopsis* (Álvarez-Buylla et al., 2019; Rounsley, 1995). Entre los que se expresan preferencialmente en la raíz de *Arabidopsis* se encuentran *AGL17*, *AGL21*, *ANR1*, *AGL16*, *AGL18*, *AGL19*, *AGL26* y *AGL56* (Álvarez-Buylla et al., 2000; Burge et al., 2002; Parenicová et al., 2003; Gan et al., 2005, 2012). También, se ha comprobado que *ANR1* y *AGL21* participan como genes clave en el

proceso de proliferación y la plasticidad de desarrollo de las raíces laterales en respuesta a nutrientes (Gan et al., 2011; Yu et al., 2014b; Zhang y Forde, 1998); mientras que *XAANTAL1* (*AGL12/XAL1*; Tapia-López et al., 2008) y *XAL2* (*AGL14*; Garay-Arroyo et al., 2013) participan en el desarrollo de la raíz primaria.

1.4. Función de *XAL2* y su interacción con *AGL24* y *SOCI* en la parte aérea de *Arabidopsis*

Como se mencionó anteriormente, *XAL2* tienen un papel clave en el desarrollo de la raíz primaria. Se expresa fuertemente en este órgano, aumentando con el tiempo de desarrollo y presentando una mayor abundancia del RNA mensajero a los nueve días post siembra (dps), con respecto al día cinco o siete (Cerón-Bustamante, 2012; Rounsley et al., 1995; Schönrock et al., 2006). En plántulas de 7 dps la expresión del mRNA de *XAL2* se localizó, mediante análisis de hibridación *in situ*, en la región meristemática de la raíz, particularmente en células de la cofia lateral, la epidermis y endodermis de la columela, mientras que en la zona de diferenciación de la raíz primaria se localizó en el cilindro vascular y en los primordios de las raíces laterales (Garay-Arroyo et al., 2013).

Para determinar la función que *XAL2* desempeña en la raíz primaria, se usaron mutantes de pérdida de función de *XAL2* (*xal2-1* y *xal2-2*), y se demostró que ambos alelos presentaban raíces cortas. Además, usando el alelo más fuerte (*xal2-2*) se vio que presenta una raíz primaria corta con un menor número de células tanto en el meristemo como en la zona de elongación y un menor tamaño de las células completamente elongadas (86%) con respecto a plántulas tipo silvestre. En *xal2-2*, la duración del ciclo celular no se altera; sin embargo, se altera la organización del nicho de células troncales y aumentan las capas indiferenciadas de la columela (que no presentan gránulos de almidón) lo que implica un retraso en la transición a la diferenciación de las células de la columela (Garay-Arroyo et al., 2013).

La participación de *XAL2* en el desarrollo de la raíz se debe, parcialmente, a que regula los niveles de auxinas mediante la inducción transcripcional de *PIN1* (*PIN FORMED PROTEIN1*) y *PIN4*, que codifican proteínas transportadoras de eflujo de las auxinas (Garay-Arroyo et al., 2013). *PIN1* y *PIN4* son dos de las cinco proteínas PIN, localizadas polarmente en la membrana plasmática de las células de la raíz, que coordinan el movimiento de las auxinas para mantener el gradiente de concentración característico de esta hormona a lo largo de la raíz, el cual provee información esencial para la división, polaridad y destino celular durante la morfogénesis (Bennett y Scheres, 2010; Blilou et al., 2005). Mientras que *PIN1* transporta las auxinas desde la base de la planta hacia la punta de la raíz, *PIN4* lo transporta hacia afuera del nicho de células madre, contribuyendo al *maximum* de concentración de auxinas en el centro quiescente (Bennett y Scheres, 2010). Sin embargo, las mutantes de *xal2-2* presentan una raíz mucho más corta que las mutantes dobles de *PIN1* y *PIN4*, lo que indica que la regulación de

PIN1 y *PIN4* por *XAL2* no explica totalmente el fenotipo de *xal2-2* (Garay-Arroyo et al., 2013). Por lo cual, es necesario emplear otros métodos para encontrar nodos adicionales en el módulo de regulación genética de *XAL2* (i.e. genes blanco e interactores) que ayuden a entender las bases moleculares por las que *XAL2* ejerce la función de promotor del crecimiento de la raíz primaria.

Recientemente, en la parte aérea de *Arabidopsis* ha sido probada una compleja interacción genética de *XAL2* con *AGL24* (*AGAMOUS LIKE 24*; AT4G24540) y *SOC1/AGL20* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 / AGAMOUS LIKE 20*; AT2G45660), dos genes MADS-box cuyo papel es clave durante la transición a la floración (Michaels et al., 2003; Pérez-Ruiz et al., 2015; Yu et al., 2002; Lee et al., 2001). Además, en ensayos de doble y triple híbrido en levaduras, se ha visto que las proteínas *SOC1* y *AGL24* interactúan físicamente y forman heterodímeros con *XAL2* (De Folter et al., 2005; Immink et al., 2009). *XAL2* y *SOC1* pertenecen al mismo clado (*SOC1/TM6*) (Lee et al., 2000), mientras que *AGL24* pertenece al clado de *SVP* (Michaels et al., 2003).

SOC1 es un gen que se expresa en raíz, hojas y meristemos, y sus niveles de expresión se incrementan de acuerdo con la edad de la planta; la proteína que codifica está altamente conservada entre angiospermas (Kazan y Lyons, 2016; Zhao et al., 2014). *SOC1* es un regulador de la organogénesis en el desarrollo de las plantas y es parte de las redes de regulación genética que integran varias señales ambientales y endógenas para promover la floración; incluyendo el fotoperíodo, la vernalización y las giberelinas (Hepworth et al., 2002; Lee et al., 2000a; Lee y Lee, 2010; Moon et al., 2003; Samach et al., 2000). La función de *SOC1* depende de su interacción con diversas proteínas, incluyendo *AGL24*, con la que es capaz de formar un heterodímero en la parte aérea de la planta (Seo et al., 2012). También, se ha demostrado que *AGL24* y *SOC1* interactúan y se regulan transcripcionalmente de manera positiva; además, se ha demostrado redundancia funcional en cuanto a la transición a la floración: las mutantes dobles de *soc1 agl24*, tienen un fenotipo más fuerte de floración tardía que cualquiera de las dos mutantes sencillas (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008; Riboni et al., 2013).

AGL24 y *SOC1* son regulados diferencialmente en muchos aspectos durante la transición floral. Primero, aunque la expresión de *AGL24* es regulada por la vernalización, éste es independiente de *FLOWERING LOCUS (FLC)*, un potente represor de la floración (Liu et al., 2008; Michaels et al., 2003). Por el contrario, *FLC* junto con *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* reprimen la expresión de *SOC1* en el meristemo de la inflorescencia (Hepworth et al., 2002). Segundo, en la vía del fotoperíodo, *AGL24* es regulado positivamente por *CONSTANS (CO)*, pero no por *FT*, pues mutantes de *co-1* presentan reducción en el mRNA de *AGL24*, pero las mutantes de *ft-1* no presentan alteraciones en su expresión; mientras que *SOC1* es principalmente regulado positivamente por *FT* e indirectamente por *CO* (Yu et

al., 2002). La pérdida de función de *AGL24* produce un retraso en la transición a la floración similar a la que produce la pérdida de función de *SOC1*, mientras que la sobreexpresión de ambos genes produce un fenotipo de transición temprana a la floración (Michaels et al., 2003). Además, los mutantes dobles de *agl24-2 soc1-2* presentan la misma la floración tardía y con el mismo número de hojas que la mutante sencilla *soc1* (Riboni et al., 2013; Yu et al., 2002). No obstante, la sobreexpresión de *AGL24* puede rescatar parcialmente, aunque no totalmente, el fenotipo de floración tardía de *SOC1*, mientras que la pérdida de *AGL24* puede suprimir significativamente la floración temprana en plantas *35S::SOC1* (Yu et al., 2002). Estos dos factores pueden regularse positivamente entre sí, ya que se ha reportado que la sobreexpresión de *AGL24* provoca una regulación positiva en la expresión de *SOC1* y un fenotipo de floración temprana, y la sobreexpresión de *SOC1* también puede causar una regulación positiva de la expresión de *AGL24* (Michaels et al., 2003). Sin embargo, el fenotipo débil de floración temprana tanto de *35S::AGL24* como de *35S::SOC1* en fondos mutantes *soc1-2* y *agl24-2*, respectivamente, indica que, además de regularse positivamente entre sí, *AGL24* y *SOC1* también pueden promover la floración de forma independiente (Lee et al., 2008; Michaels et al., 2003; Yu et al., 2002).

XAL2 está involucrado en la promoción de la floración y en el mantenimiento de la identidad de las células del meristemo floral de *Arabidopsis* a través del mismo módulo de regulación genética que *SOC1* y *AGL24* en respuesta al fotoperíodo y a las giberelinas (Pérez-Ruiz et al., 2015). De hecho, las plantas sobreexpresoras de *XAL2* presentan un fenotipo de floración precoz y con flores anormales, similar al fenotipo de las sobreexpresoras de *SOC1* y *AGL24*. Por lo anterior Pérez-Ruiz et al. (2015) evaluaron la interacción genética de *XAL2* con *SOC1* y con *AGL24* durante el proceso de floración, a través de un análisis de epistásis con mutantes dobles *xal2-2 soc1-6* y *xal2-2 agl24-4*. Se observó una interacción genética distinta dependiendo del fotoperíodo y de las características evaluadas: tiempo de floración y número de hojas de roseta presentes en el momento de la emisión de la inflorescencia meristemo floral. Lo anterior muestra que *XAL2* comparte funciones con *SOC1* y con *AGL24*, y al mismo tiempo presenta funciones independientes en la parte aérea de la planta. Concretamente, en fotoperíodo de día largo, *soc1-6* presenta mayor retraso en la transición a la floración y es epistático a *xal2-2*; en cambio, el número de hojas de roseta en la mutante doble *xal2-2 soc1-6* es intermedio al de ambos parentales (Pérez-Ruiz et al., 2015). Por otro lado, en fotoperíodo de día corto, *xal2-2* es epistático sobre *agl24-4* en el retraso en la transición a la floración; además *xal2-2* tiene un menor número de hojas y es epistático a *soc1-6* y a *agl24-4* (Pérez-Ruiz et al., 2015). De manera interesante, en condiciones de día corto, la aplicación de giberelinas suprimió el fenotipo de floración tardía de todas las mutantes, a excepción de *xal2-2 soc1-6* donde no tuvo efecto aún después de 88 dps, a causa del fenotipo aditivo de

los parentales (Pérez-Ruiz et al., 2015). Así mismo, *xal2-2 soc1-6*, presenta un fenotipo aditivo en la alteración de la expresión de genes de biosíntesis y catabolismo de las giberelinas. Lo anterior indica que *XAL2* y *SOC1* participan de forma independiente tanto en el mecanismo de inducción de la floración por giberelinas, como en el metabolismo mismo de las giberelinas, aunque formen parte de la misma red de regulación genética (Pérez-Ruiz et al., 2015). Además, *xal2-2* presenta una disminución en los niveles de mRNA de *SOC1* y *AGL24*. A su vez, los transcritos de *XAL2* disminuyen en plantas de sobreexpresión de *SOC1*; no obstante, la pérdida de función de *SOC1* y *AGL24* no afectan la expresión de *XAL2*. Lo anterior sugiere que, en la transición floral en día largo, *XAL2* regula positivamente a *SOC1* y *AGL24*, mientras que *AGL24* no parece regular a *XAL2* y *SOC1* lo podría estar regulando negativamente (Pérez-Ruiz et al., 2015).

Por otro lado, varios datos muestran que *AGL24* y *SOC1* se expresan en la raíz de *Arabidopsis* (Bouché et al., 2016; Gan et al., 2005, 2010, 2011; Lee et al., 2000; Schönrock et al., 2006; Yu et al., 2002). No obstante, la participación de *AGL24* en el desarrollo de este órgano no ha sido explorada. En cambio, se ha determinado el aumento de la expresión de *SOC1* en los sitios de producción de raíces laterales en plantas silvestres; y mutantes de pérdida de función *agl20-2* exhiben una disminución en los sitios de preramificación y en el número de raíces laterales. Lo que indica que *SOC1* está involucrado en el mecanismo que determina el patrón de distribución de raíces laterales en la zona de diferenciación de la raíz primaria y en el número de las mismas (Moreno-Risueno et al., 2010). Además, análisis de transcriptómica y de microarreglos de raíz han demostrado que *SOC1* presenta una alta coexpresión con *XAL2* (Bouché et al. 2016; Zluhan- Martínez et al., datos no publicados).

Debido al papel que juegan las proteínas con dominio-MADS *XAL2*, *AGL24* y *SOC1* en la parte aérea y a que *AGL24* y *SOC1* se expresan en la raíz primaria, pensamos que *AGL24* y *SOC1* también podrían estar involucrados en el crecimiento de la raíz primaria e incluso podrían estar actuando en interacción genética con *XAL2* en este órgano.

1.5. Efectos del estrés osmótico en el crecimiento de la raíz primaria

El crecimiento de la raíz requiere de un mecanismo regulador complejo que integra tanto señales externas como internas (Drisch y Stahl, 2015; Yu et al., 2014a). Los genotipos se expresan a través de mecanismos dinámicos multiestables, dirigidos por factores tanto internos como externos, resultando en el ajuste de características funcionalmente apropiadas que modelan el fenotipo. De tal manera que el genotipo puede ser entendido como un repertorio de resultados potenciales del desarrollo correlacionados con diferentes combinaciones de activación de genes, en lugar de un programa de

desarrollo fijo (Sultan y Sultan, 2017). Por lo tanto, una estrategia para explorar los diversos fenotipos del crecimiento de la raíz primaria que un mismo genotipo pudiera expresar (en el caso de este trabajo, las mutantes de pérdida de función de los genes *XAL2*, *AGL24* o *SOCI*), es someterlo a diferentes condiciones ambientales; ya que los cambios en el crecimiento de la raíz están estrechamente relacionados con las perturbaciones internas y externas (Hsiao y Xu, 2000; Malamy, 2005; Rellán-Álvarez et al., 2016).

El estrés es definido como cualquier factor que perturba el funcionamiento normal de un organismo (Kramer, 1980). La sequía es un estrés ambiental primario que afecta el crecimiento vegetal, debido a que reduce el potencial hídrico del suelo (Ψ_w), limitando el agua disponible para ser absorbida por las plantas y provocándoles un déficit hídrico interno (Blum y Tuberosa, 2018; Boyer, 1982). En las plantas, el agua es indispensable para el transporte de nutrientes, como solvente para reacciones metabólicas y para generar presión de turgencia para el crecimiento (Hsiao y Xu, 2000; Scharwies y Dinneny, 2019). Además, en condiciones óptimas de humedad, el agua llega a constituir cerca del 90% del peso total de las plantas herbáceas, como en el caso de *Arabidopsis* (Gímenez et al., 2005).

En el laboratorio, una forma de mimetizar *in vitro* los efectos producidos por la sequía es manipular el componente osmótico del potencial hídrico del medio de cultivo (i.e. el potencial osmótico Ψ_o), mediante la adición de osmolitos o solutos de peso molecular alto como el polietilenglicol o azúcares como el manitol o el sorbitol, para generar condiciones de estrés osmótico (Chen y Fluhr, 2018; Michel, 1983; Munns, 2002; Verslues et al., 2006). El agua pura tiene un potencial hídrico igual a cero MPa ($\Psi_w = 0$ MPa); este potencial expresa la energía libre de las moléculas de agua para moverse. La presencia de solutos en una solución reduce el potencial químico del agua y el potencial hídrico disminuye ($\Psi_w < 0$ MPa; Kramer 1983).

La raíz tiene un papel crucial para contribuir a la sobrevivencia de las plantas, pues además de absorber y transportar agua y minerales, es el órgano que inicialmente percibe los cambios en la disponibilidad del agua del suelo o medio de cultivo al estar en contacto directo con él (Davies y Zhang, 1991; Yu et al., 2014b). *Arabidopsis* es una planta con la raíz pivotante, típica de las dicotiledóneas, que se caracteriza por presentar una dominancia apical de la raíz primaria (Feng y Lindner, 2016; Kooyers, 2015). En plántulas de diversas accesiones de *Arabidopsis*, la longitud de la raíz primaria es el parámetro de la arquitectura de la raíz más afectado por estrés osmótico severo (Cajero-Sánchez, 2018). La raíz responde plásticamente a las condiciones cambiantes del medio ambiente; por ejemplo, a los cambios de disponibilidad de agua en el medio. Incluso, el crecimiento de las raíces de diversas plantas en respuesta al estrés hídrico es menos inhibido que el de la parte aérea (Castelán-Muñoz et al., 2015;

Durand et al., 2016; Turner y Begg, 1981). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la exposición a potenciales osmóticos entre -0.3 y -0.47 MPa en el medio, considerados como estrés moderado, causa la inhibición del crecimiento de la parte aérea y promueven el crecimiento de la raíz primaria (van der Weele et al., 2000; Xu et al., 2013). Idealmente, esta respuesta le permite a la raíz primaria llegar a zonas más profundas del suelo donde, en condiciones naturales, hay mayor disponibilidad de agua para poder absorberla (Durand et al., 2016). En contraste, potenciales hídricos inferiores a -0.5 MPa causan un impacto negativo sobre el crecimiento de la raíz primaria (Hummel et al., 2010; Shabala y Lew, 2002). De forma que, la exposición a potenciales hídricos entre -0.5 y -1.6 MPa pueden causar un estrés de moderado a severo; mientras que potenciales hídricos por debajo de -1.6 MPa pueden llegar a ser letales (Bhaskara et al., 2012, 2015).

Los cambios en la regulación genética, el metabolismo y del desarrollo dependen del sistema de cultivo, la duración y la severidad del estrés, de la etapa del ciclo de vida en la que se encuentre la planta, y de la especie de la que se trate (Verslues et al., 2006). Las plantas presentan diversas respuestas como el escape, la evasión o la tolerancia a los bajos potenciales hídricos, o daños irreversibles e incluso la muerte (Osakabe et al., 2014). Ante la percepción de déficit hídrico en las plantas se activan múltiples mecanismos de señalización de comunicación cruzada; por ejemplo, vías dependientes de calcio, de inositol trifosfato, de especies reactivas de oxígeno (EROs) o de nitrógeno, proteínas cinasas, fosfatasas, fitohormonas, entre otros; que conducen a la regulación metabólica y transcripcional (Boudsocq y Laurie, 2005; Kreps et al., 2002; Xiong et al., 2002; Zhu, 2016).

Las principales hormonas vegetales como auxinas, citoquinina, ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides, etileno, giberelinas son reguladores clave de la división celular y la elongación que conducen el crecimiento de la raíz primaria en condiciones óptimas de crecimiento y en estrés (Antoniadi et al. 2005; Dello Ioio et al., 2007; Kinoshita et al., 2012; Ortega-Martínez et al., 2007; Rowe et al., 2016). Adicionalmente, hormonas como el ácido salicílico, el ABA y el ácido jasmónico son considerados como componentes importantes que regulan las vías de señalización al estrés (Torres y Dangl, 2005; Wasilewska et al., 2008). El análisis de mutantes de respuesta a diferentes hormonas ha mostrado que existe una comunicación cruzada entre las vías hormonales en el crecimiento de la raíz (Bielach et al., 2017; Deak y Malamy, 2005; Li et al., 2017; Thole et al., 2014; Xing et al., 2016). No obstante, una gran cantidad de procesos de respuesta a estrés por baja disponibilidad de agua están regulados a través del ABA, de tal forma que las respuestas al estrés tradicionalmente se han clasificado entre dependientes e independientes de ABA (Hsiao y Xu, 2000, Sharp y LeNoble, 2002; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000, 2007; Yoshida et al., 2010, 2014).

El análisis de la regulación genética mediante microarreglos y RNAseq ha mostrado que los genes inducidos por el estrés podrían clasificarse según las funciones de sus productos en las respuestas celulares (Bohnert et al. 2001; Dinneny et al., 2008; Seki et al. 2001; Zhu et al. 2001; Geng et al., 2013). Entre éstas destacan los genes involucrados en la biosíntesis de osmolitos para modular la turgencia celular como en la osmoprotección, como son la prolina, la glicina betaína y azúcares; genes de las enzimas de desintoxicación de EROs; proteínas para la protección de macromoléculas (proteína LEA); además de genes que regulan los procesos necesarios para el metabolismo primario y el desarrollo (Agarwal 2006; Broeck et al., 2015; 2017; Chen et al., 2002; Ishitani et al., 1997; Kilian et al., 2007; Nikonorova et al., 2018; Osakabe et al., 2013; Verslues, 2011).

Las proteínas que regulan la transducción de señales y la expresión genética en respuesta al estrés osmótico y deshidratación incluyen tanto a los factores de transcripción de las familias: ABRE-BINDING FACTOR/ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (AREB/ABF), DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING (DREB2), BASIC LEUCINE ZIPPER (bZIP), MYC/ MYB, WRKY, Zn-finger, BASIC HELIX-LOOP-HELIX-ZIP (bHLH), NAM, ATAF1/2 y CUC2 (NAC); como a las proteínas cinasas MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK), CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE (CDPK), (Li et al. 2019; Agarwal y Jha 2010; Kang et al. 2002; Q. Zhu et al. 2019; Liu et al. 2015; Xu et al., 2013b Yoshida et al. 2015; S.-Y. Zhu et al. 2007). Además, también se han reportado micro-RNAs (miRNA) que participan en la regulación postranscripcional en respuesta al estrés osmótico (Kinoshita et al., 2012).

A nivel celular, el estrés osmótico afecta todas las zonas de desarrollo de la raíz (Deak et al., 2005; Liu et al., 2015; Pritchard, 1994; Rowe et al., 2016). La división celular y la elongación celular se reducen, lo que resulta en una menor tasa de crecimiento de la raíz primaria (Rowe et al., 2016; van der Weele et al., 2000; West et al., 2004). La disminución del crecimiento del meristemo implica la reducción de la producción celular (van der Weele et al., 2000). Análisis de cinéticas de crecimiento de la raíz muestran que, en presencia de un estrés osmótico-iónico (NaCl 0.5%), el crecimiento de la raíz es aproximadamente constante, pues no hay aumento en el número de células en división. En contraste, en el medio sin NaCl la tasa de crecimiento de la raíz primaria se acelera con el tiempo, como resultado de un número creciente de células en división; debido a lo anterior, hay más células que transitan a la zona de elongación (Beemster y Baskin, 1998; Ivanov y Dubrovsky, 2013; West et al., 2004).

Además, en estrés osmótico las células transitan de la proliferación a la elongación en un tamaño más pequeño, lo que resulta en un meristemo apical más pequeño y esta reducción inicial se mantiene a medida que las células se elongan (van der Weele et al., 2000; West et al., 2004). West et al., (2004)

observaron que inmediatamente después de la transferencia al medio con NaCl, las plantas tienen una inhibición temporal de la actividad mitótica que permite la adaptación a esta condición de estrés. Estos autores además reportan que, después de tres días en NaCl, la actividad del ciclo celular vuelve a los valores del control, pero con un tamaño reducido del meristemo, por lo que hay menos producción celular. Los autores proponen que la respuesta al estrés osmótico-iónico implica dos fases: primero, una rápida fase de inhibición transitoria del ciclo celular que da como resultado que queden menos células en el meristemo, y un posterior recobro de la duración del ciclo celular a nivel de las plantas que están creciendo en condiciones control (West et al., 2004). Análisis sobre la variación en la regulación transcripcional entre las diferentes zonas de la raíz primaria en respuesta al estrés osmótico-iónico. Además, de que hay una alta variación de genes expresados (entre 50-82%) específicos de cada zona, lo que indica que el estrés regula distintos procesos en función del contexto de desarrollo (Dinny et al., 2008).

El proceso de elongación requiere de un incremento irreversible del volumen celular que ocurre gracias a que hay una relajación de la pared celular y a la expansión de la vacuola. Por otro lado, la elongación depende de la turgencia celular e involucra la remodelación de la pared celular (Osakabe et al., 2013; Pacifici et al., 2018). La extensión de la pared celular, explicada por la teoría del crecimiento ácido, implica el eflujo de protones desde el citosol hacia el apoplasto, mediado por la H⁺-ATPase de la membrana plasmática (Schopfer et al., 2002). Xu et al. (2013) reportaron que ante un estrés osmótico moderado que estimula el crecimiento de la raíz primaria ($\Psi_o = -0.47$ MPa), el eflujo de protones hacia el apoplasto se promueve en la zona de elongación, generando el ablandamiento y la extensión de la pared celular, necesarios para la elongación. Este mecanismo es controlado por procesos diversos entre los que destaca la homeostasis del estado de óxido reducción (redox). La homeostasis redox ocurre mediante el balance de la producción de EROs como el superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los radicales hidroxilo (-OH) y su remoción mediante la inducción del sistema antioxidante (Liszky et al., 2004). Las EROs, son moléculas relativamente simples que se producen continuamente en las células en crecimiento en condiciones aeróbicas. En las plantas, las EROs se producen continuamente, predominantemente en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas (Foyer, 2018).

Entre las enzimas productoras de EROs se encuentran las NADPH-oxidasas, amino oxidasas, quinona reductasas, lipoxigenasas, peroxidasas clase III y oxalato oxidasas. No obstante, la mayor producción de EROs ocurre vía NADPH-oxidasas o vía la superóxido dismutasa (Kärkönen y Kuchitsu, 2015; Suzuki et al., 2018). Las NADPH-oxidasas *Arabidopsis thaliana* RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (AtRboh) son las enzimas asociadas a la membrana plasmática que catalizan la

reducción de oxígeno en superóxido, como paso previo a la generación de H_2O_2 de manera dependiente de NADPH durante los procesos de respiración en la mitocondria y plastidios (He et al., 2012; Jiao et al., 2013; Kwak et al., 2003; Sirichandra et al., 2009). Se ha reportado que, ROOT HAIR DEFECTIVE2 RHD2/AtRboh C, está involucrado en el crecimiento de pelos radicales (Foreman et al., 2003); mientras que AtRboh D y AtRboh F son necesarias para el alargamiento de la raíz (Jiao et al., 2013).

El dominio catalítico de la NADPH oxidasa se dirige hacia el apoplasto, por lo cual el superóxido se libera hacia el espacio apoplástico. Este superóxido se dismuta en H_2O_2 y O_2 de forma espontánea o de forma enzimática por la actividad catalítica de la superóxido dismutasa o las peroxidases (Cosio et al., 2009; Tsukagoshi, 2016). Posteriormente, y a partir de H_2O_2 , de forma enzimática mediante las peroxidases, las catalasas, o de forma no enzimática en presencia de un reductor como el glutatión, el ascorbato o un metal de transición como Fe^{2+} o Cu^+ por la reacción de Fenton, se genera el radical $-OH$ (Dunand et al., 2007). El $-OH$ rompe los enlaces entre los polisacáridos de la pared celular y produce el ablandamiento de la pared celular, permitiendo la elongación; mientras que la inhibición de la producción de $-OH$ provoca la supresión de la elongación de la raíz (Liszkay et al., 2004; Schopfer et al., 2002). Además de desempeñar funciones importantes tanto en el ablandamiento de la pared celular durante la elongación celular, el radical OH puede actuar enlazándose a los residuos de tirosina, abundantes en las proteínas estructurales de la pared celular, y la lignina, ocasionando la rigidez de la pared celular y restringiendo el crecimiento celular (Dunand et al., 2007).

Si bien las EROs sirven como moléculas de señalización para regular muchos procesos biológicos, en las células de la raíz son necesarias para su desarrollo óptimo (revisado por Tsukagoshi, 2016) y para estimular el crecimiento en estrés moderado (Kwak et al., 2006). Debido a su alta reactividad y potencial toxicidad, pueden ser muy perjudiciales para las células vegetales, dañando el ADN, y conducir al daño oxidativo en lípidos y proteínas; e incluso, si los niveles de EROs son suficientemente altos, pueden provocar muerte celular y en última instancia, conducir a la muerte de las plantas (Miller et al., 2010).

Los niveles de las EROs están controlados espacio-temporalmente, en las diferentes regiones de la raíz, mediante la distribución y actividad de las enzimas productoras de EROs (Apel y Hirt 2004). Las células del nicho celular presentan anoxia y por lo tanto están libres de EROs, mientras que en las células en proceso de elongación en la zona de elongación, presentan niveles altos de H_2O_2 y niveles bajos de actividad de peroxidases totales (Dunand et al., 2007; Tsukagoshi et al., 2010; Wrzaczek et al., 2013). La producción de EROs en el apoplasto, además de regular el metabolismo de la pared celular, participa en la transducción de señales. Las EROs son especialmente importantes para mantener el

equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular (Foyer et al., 2018), por lo tanto, pueden funcionar como moléculas de señalización potente que ajustan el crecimiento y el desarrollo en respuesta al estado de desarrollo y las condiciones ambientales (Apel y Hirt, 2004). Entre los efectos directos del H₂O₂ se ha señalado la modificación postraducciona de proteínas mediante la oxidación de residuos de azufre, cisteína y metionina (Foyer et al., 2018). Entre las proteínas blanco de oxidación se encuentran enzimas que ajustan directamente el metabolismo celular y proteínas de señalización, como las quinasas, fosfatasa, y factores de transcripción (Considine y Foyer, 2014; He et al., 2012; Noctor y Foyer, 2016). Adicionalmente, las EROs pueden modular el crecimiento de la raíz mediante la oxidación o la degradación de las hormonas vegetales como son las auxinas y el ABA (Gazarian et al., 1998). Por lo tanto, la plasticidad en el crecimiento de la raíz, controlada a través de la señalización de EROs, puede ser dependiente o independiente de su interacción con las vías hormonales (Hong et al., 2013).

La concentración de EROs en las plantas puede aumentar desproporcionadamente bajo diversas condiciones ambientales adversas (Smirnoff, 2007). Sin embargo, la homeostasis redox se produce por una red interconectada con moléculas enzimáticas y no enzimáticas antioxidantes que remueven los EROs, incluidas el superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa de ascorbato, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, dehidroascorbato reductasa, monodehidroascorbato libre y glutatión reductasa. Por lo cual, el estado redox resulta ser un sistema regulador flexible en respuesta a condiciones de estrés (De Tullio et al., 2010; Rahantaniaina et al., 2013).

1.6. El papel del ácido abscísico en la regulación del desarrollo de la raíz primaria de Arabidopsis

Las fitohormonas son componentes importantes que integran las señales ambientales al desarrollo de las plantas y regulan los procesos de crecimiento en respuesta a estrés (Peleg y Blumwald, 2011). Así mismo, destaca una alta interacción entre los componentes de las vías de regulación del metabolismo y la señalización de las fitohormonas que participan en el desarrollo de la raíz (Ephritikhine et al., 1999; Heja y Benkova, 2009; Ubeda-Tomás et al., 2012; Xing et al., 2006). En Arabidopsis se ha demostrado que las respuestas al estrés osmótico son reguladas a través de mecanismos reconocidos como dependientes o independientes del ABA (Sakuma et al., 2006; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000, 2007; Yoshida et al., 2010, 2014).

El aumento en las concentraciones de los niveles fisiológicos del ABA, es una de las respuestas primarias ante la disminución del potencial osmótico (Priest et al., 2006; Sivakumaran y Hall, 1978; Fujita et al., 2011). El ABA es una fitohormona isoprenoide, sus precursores se sintetizan en los plastidios por la vía de los carotenoides a partir de la zeaxantina, que posteriormente se transforma en

xantoxina antes de su traslocación al citoplasma donde se completan los últimos pasos de oxidación para la síntesis del ABA activo (Nambara y Marion-Poll, 2005). El nivel del ABA celular depende de las tasas relativas de su biosíntesis, su catabolismo (Dong et al., 2014; Kushiro et al., 2004) y el transporte para su distribución en toda la planta, su conjugación y su activación (Kuromori et al., 2018). De tal forma, que el ABA está disponible para actuar como una señal para la regulación de numerosos procesos moleculares, fisiológicos y morfológicos durante momentos específicos del desarrollo y frente a diferentes condiciones de disponibilidad hídrica (Boudsocq y Laurie, 2005; Du et al., 2018;; Gao et al., 2016; Smith y Griffiths, 1993; Yoshida et al., 2015b). Cabe resaltar que el ABA tiene una participación muy importante, mayor que cualquier otra hormona, en la regulación de genes codificantes de proteínas, regulando el 10% de ellos en respuesta a estrés osmótico (Fujita et al., 2011).

Son varios los procesos de desarrollo que ABA regula: la latencia de semillas y meristemas, el crecimiento post germinativo de la raíz y la parte aérea, y la senescencia (Gao et al., 2016; Riboni et al., 2016; Rohde y Bhalerao, 2007; Yoshida et al., 2015). Adicionalmente, entre las respuestas al déficit hídrico mediadas por ABA se encuentran la modulación de la conductividad hidráulica, el control del cierre estomático, la síntesis de moléculas osmoprotectoras, la degradación de la clorofila, el control del tiempo de floración, los cambios en la asignación de biomasa en la relación raíz/parte aérea y en la arquitectura de la raíz, la latencia de yemas axilares, entre otras (De Smet et al., 2003; Cheng et al., 2002; Barrero et al., 2005; Rosales et al., 2019; Wang et al., 2019).

La expresión genética dependiente de ABA está regulada principalmente por dos familias de factores de transcripción tipo bZIP (Fujita et al., 2011). En el genoma de *Arabidopsis* los bZIP están conformados por nueve miembros divididos en dos grupos: ABA INSENSITIVE 5 (ABI5, EEL, DPBF2/ATbZIP67, DPBF4 y AREB3) y los ABF/AREB (ABF1, AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 y ABF3) (Ng et al., 2014). Estos factores de transcripción se unen a los elementos de respuesta a ABA (cajas *ABRE*) en las regiones reguladoras de sus genes blanco (Nakashima et al., 2009; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Adicionalmente, hay otros factores de transcripción de diferentes familias: B3-domain, DREB/AP2/ERF, FBH3, MYB, NAC, NF-YB2, HB, HD-ZF, RD, ZAT que participan en la vía de transducción de señales de ABA en respuesta a estrés osmótico (Finkelstein et al., 2005; Fujita et al., 2011; Song et al., 2016; Zhu et al. 2010). Un análisis del transcriptoma de *Arabidopsis* mostró que, en respuesta a estrés osmótico, el 70% de los genes río abajo de la vía de ABA son afectados en la mutante cuádruple *areb1 areb2 abf3 abf1*, lo cual indica que esos cuatro *AREB/ABFs* son los factores transcripcionales más importantes en la señalización de ABA durante el crecimiento vegetativo (Yoshida et al., 2015).

De manera interesante, el control de la plasticidad de la raíz en respuesta a estrés osmótico mediado por el ABA tiene un comportamiento bifásico con efectos morfológicos opuestos (Li et al., 2017b). Esto quiere decir que el ABA puede estimular o reprimir el crecimiento de la raíz dependiendo de su concentración en función del déficit hídrico que enfrente la planta (Evans, 1984; Zhang et al., 2010). De tal forma que, para mantener el crecimiento de la raíz en condiciones ambientales óptimas y en estrés osmótico ligero, se requiere de una concentración fisiológica de ABA endógeno cercana a 0.5 μM (Fujii et al., 2007; Li et al., 2017b; Sharp et al., 2004; Xu et al., 2013).

En ese mismo sentido, la aplicación exógena de ABA a concentraciones menores a 1 μM en el medio de cultivo, estimula el crecimiento de la raíz (Zhang et al., 2010). Por el contrario, en condiciones ambientales que generan estrés osmótico medio o severo, los niveles fisiológicos de ABA aumentan drásticamente, incluso hasta 50 veces en condiciones de Ψ_w -0.8 MPa (Christmann et al., 2005; Fujita et al., 2011; Sivakkumaran y Hall, 1978). Por otro lado, cuando se aplica ABA exógeno a concentraciones mayores a 1 μM , se produce una inhibición del crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales (Ephritikhine et al., 1999; Xing et al., 2016). Además, estudios pioneros mostraron una similitud entre los efectos en el crecimiento de la raíz en condiciones de estrés osmótico y los tratamientos de aplicación de ABA, indicando que los efectos debido al estrés osmótico son, en parte, mediados por cambios en los niveles de ABA endógenos (Creelman et al., 1990).

Por otro lado, Zhang et al. (2010b) demostraron que concentraciones bajas de ABA estimulan el crecimiento de la raíz en plántulas de *Arabidopsis* debido a un incremento en el número de células del meristemo apical de la raíz primaria. Lo anterior se debe a un retardo en la tasa de diferenciación y a un desarreglo en el nicho de células madre, ya que ABA participa en el mantenimiento del mismo al promover la quiescencia del centro quiescente, y en mantener indiferenciadas las células iniciales de la columela a través de la regulación de los genes de respuesta a auxinas. Puesto que ABA induce la expresión de *MONOPTEROS (MP)*, *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)* (Zhang et al., 2010) y reprime la expresión de *PLETHORA (PLT1 y PLT2)* (Yang et al., 2014). Se ha visto que el ABA afecta tanto a la elongación como a la división celular en la zona de crecimiento de la raíz (Han et al., 2013; Zhu et al., 2007; Zhang et al., 2010) y algunos de estos procesos, involucran la participación de otras hormonas y otras moléculas señalizadoras, como son las EROs y el calcio (Ephritikhine et al., 1999; Heja y Benkova, 2009; Ubeda-Tomás et al., 2012; Xing et al., 2006).

Por otro lado, es muy importante la interacción entre las vías de señalización de ABA y de las auxinas; ABA regula el transporte de auxinas, las cuales a su vez, activan una H^+ -ATPasa en la membrana plasmática para promover la secreción de protones hacia el apoplasto en el ápice de la raíz,

promoviendo la extensión de la pared celular necesaria para el crecimiento de la raíz (Xu et al., 2013). De esta forma ABA podría desempeñar un papel en la modulación de la distribución de auxina en la zona de elongación de la raíz (Yamaguchi y Sharp, 2010). También se ha reportado que el factor de transcripción de la familia con dominio-B3 ABA INSENSITIVE 3 (ABI3), que es fosforilado en respuesta a ABA, está involucrado en la señalización de las auxinas y el desarrollo de las raíces (Brady et al., 2003). Así mismo, ABI4, de la familia bZIP, está involucrado en la regulación del transporte de auxinas hacia la raíz primaria y la iniciación de las raíces laterales a través de la regulación de *PINI*. Adicionalmente, ABA está involucrado en mantener el crecimiento de la raíz en condiciones de bajos potenciales osmóticos, en parte, reduciendo la biosíntesis de etileno (Li et al., 2017a; Sharp et al., 2004). Así mismo, ABA induce una enzima involucrada en la degradación de la pared celular, la xiloglucano endotransglicosilasas (XET), que es necesaria para que ocurra el ablandamiento y permitir la elongación en la raíz en plantas que crecen en bajo potencial hídrico (Wu et al., 1994).

1.7. Participación de *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* en la regulación del estrés abiótico

Numerosos trabajos han reportado la alteración en la expresión, así como el papel de diversos genes MADS-box en respuesta a factores abióticos estresantes, como el estrés hídrico, osmótico, salino, oxidativo o las deficiencias nutrimentales en *Arabidopsis* y en otras especies vegetales (revisado en Castelán-Muñoz et al., 2019). No obstante, pocos trabajos dan cuenta de la participación de *AGL24*, *SOCI* y *XAL2*, en la regulación de los procesos de desarrollo en respuesta a estrés abiótico; de los tres, *SOCI* ha sido el más estudiado de los tres genes.

En datos de microarreglos (Kilian et al., 2007) se ha visto que la expresión de *AGL24* disminuye en el vástago, en respuesta a diversos factores de estrés abiótico como son el estrés osmótico, la deshidratación, la salinidad, el estrés oxidativo y por temperaturas altas. Además, su expresión aumenta levemente en respuesta a ABA 100 μ M exógeno en las células guarda de los estomas (Yang et al., 2008) y en células cultivadas en ABA 50 μ M (Böhmer y Schroeder, 2011). Sin embargo, no se encontraron reportes de análisis funcionales de *AGL24* vinculados a los mecanismos de respuesta a estrés abiótico.

Por otro lado, *SOCI* está involucrado en la inducción de la floración precoz ante condiciones de sequía en día largo (16 h de luz al día) (Hwang et al., 2019; Riboni et al., 2013, 2016). Este mecanismo adaptativo es ampliamente reconocido en plantas herbáceas como una respuesta de escape a la sequía. Por otro lado, y según Riboni et al. (2013, 2016), en plantas expuestas a la sequía en condiciones de día largo, el aumento en la expresión de *SOCI* activa el mecanismo genético que acelera la floración en *Arabidopsis* mediado por ABA. En esas condiciones, las mutantes de *soci-2* no transitan a la floración

o presentan una respuesta de escape a la sequía inhibida, y exhiben una reducción de los niveles de *TWIN SISTER OF FT (TSF)*. En cambio, las mutantes sencillas de *agl24-2* no exhiben defectos en la respuesta de escape a la sequía, mientras que la respuesta de la mutante doble *soc1-2 agl24-2* es igual a la mutante sencilla *soc1-2*. Lo anterior sugiere que, para que ocurra la respuesta de escape, se requiere que *SOCI* medie el control transcripcional de *TSF*. Recientemente Hwang et al. (2019) han demostrado que para activar dicho mecanismo de escape, la expresión de *SOCI* es inducida de forma directa por el complejo proteico formado por ABF3/4 y NUCLEAR FACTOR Y SUBUNIT C (NF-YC), de forma dependiente de ABA.

Además, se conoce un proceso de retardo del tiempo de floración ligado a la respuesta a estrés ambiental a través de la regulación de un microRNA, el miRNA156. El aumento en la expresión del miRNA156 regula negativamente la expresión de *SOCI*, a través de la inhibición de su activador SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEINLIKE 9 (SPL9), que provoca la inhibición del desarrollo de la inflorescencia y al mismo tiempo y por otra vía, induce la síntesis de antocianinas (Cui et al., 2014; Fornara y Coupland, 2009; Kazan y Lyons, 2016). También, se ha visto que la expresión de *SOCI* responde diferencialmente a la deficiencia de nutrientes. *SOCI* es inducido por deficiencia de fósforo y azufre, y es reprimido al ser agregados posteriormente al medio (Gan et al., 2005, 2011).

Finalmente, la expresión de *XAL2* disminuye en 44% cuando se añade azufre después de un período de privación de este nutriente mientras que, en privación de nitrógeno, la expresión de *XAL2* aumenta en 80% con respecto a condiciones óptimas de crecimiento (Gan et al., 2011). Además, se ha demostrado que el mensajero de *XAL2* se mueve de la parte aérea de la planta a la raíz únicamente en condiciones de déficit de nitrógeno (Thieme et al., 2015). Todos estos datos sugieren que *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* posiblemente podrían ser regulados e incluso de manera conjunta por las vías generales de respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis*, como la vía dependiente de ABA.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En esta investigación se realizó una caracterización inicial de la función de los genes MADS-box tipo II *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*, tanto en condiciones óptimas de humedad como en condiciones de estrés osmótico. Para llevar a cabo lo anterior se analizó la longitud de la raíz primaria de mutantes sencillas de pérdida de función *xal2-2*, *agl24-4* y *soc1-6*, y mutantes dobles de *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6*. Además, para determinar cómo se afecta la proliferación y la elongación celular en las diferentes líneas genéticas en condiciones de estrés

osmótico severo ($\Psi_0 = -0.85$ MPa), se analizaron los perfiles de longitud celular en los diferentes dominios del meristemo apical y la zona de elongación de dichas mutantes.

Posteriormente, para buscar indicios sobre si la actividad de los genes *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* es requerida durante el mecanismo de modulación del crecimiento de la raíz dependiente de ABA; se evaluó si las mutantes exhiben una respuesta diferencial a las plantas silvestres en la longitud de la raíz primaria en exposición a diferentes concentraciones de ABA y de fluridona, un inhibidor de la síntesis de ABA.

Finalmente, decidimos analizar la abundancia de las proteínas de la raíz de *Arabidopsis* en las diferentes líneas genéticas estudiadas, que nos podrían ayudar a hacer asociaciones de *AGL24* y *SOC1* con *XAL2*, en términos de su función molecular de los procesos biológicos que pudieran estar regulando, y avanzar en la explicación del fenotipo de raíz corta tanto de la mutante sencilla *xal2-2* como de las mutantes dobles. Dilucidar la contribución en el crecimiento de la raíz primaria de otros genes MADS-box, como *SOC1* y *AGL24*, que interactúan con *XAL2* en la parte aérea de la planta, puede ayudar a interpretar el papel de los genes MADS-box en el crecimiento de la raíz y entender las interacciones genéticas existentes entre genes de esta misma familia con *XAL2*.

Aunado a este proyecto de investigación realizamos una revisión de literatura sobre el rol de diversos genes MADS-box en respuesta a factores abióticos de estrés en *Arabidopsis* y en otras especies vegetales, esta publicación se encuentra en el Anexo de la tesis.

2.1. HIPÓTESIS

- ❖ Los genes *AGL24* y *SOC1* son promotores del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* y para ello interactúan con *XAL2*.
- ❖ Los genes MADS-box *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* participan en la respuesta a estrés osmótico en la raíz primaria.
- ❖ Los genes *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* participan en la regulación del crecimiento de la raíz mediado por ácido abscísico.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo general

Establecer si los genes *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* participan en la misma vía de regulación del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*, tanto en condiciones óptimas de crecimiento, como en condiciones de estrés osmótico y de forma dependiente del ácido abscísico.

2.2.2. Objetivos específicos

- ❖ Caracterizar la función de *AGL24* y *SOCI* en el crecimiento de la raíz primaria y establecer si ocurre una interacción genética de estos dos genes con *XAL2* para llevar a cabo esa función en condiciones óptimas de humedad y en condiciones de estrés osmótico severo.
- ❖ Establecer si *AGL24* y *SOCI* participan en la regulación de los procesos de proliferación y elongación celular que dirigen el crecimiento de la raíz primaria, en interacción genética con *XAL2* y en función del potencial osmótico en el medio de crecimiento.
- ❖ Determinar si la función de *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* en la modulación del desarrollo de la raíz primaria está mediada por la señalización del ácido abscísico.
- ❖ Identificar proteínas cuya abundancia sea afectada por *XAL2*, *AGL24* y *SOCI*, como posibles blancos o componentes adicionales en la red de regulación del crecimiento de la raíz en la que participan dichos genes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas con fondo genético de la accesión Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis* con 6 a 11 días de edad post siembra (dps) de las siguientes líneas: mutantes homocigotas con inserción de T-DNA en *agl24-4* (GK674F05.3/N385337), *soc1-6* (Salk_138131), con inserción de transposón En8130 en *xal2-2* (Garay-Arroyo et al., 2013) y las mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* (Pérez-Ruiz et al., 2015).

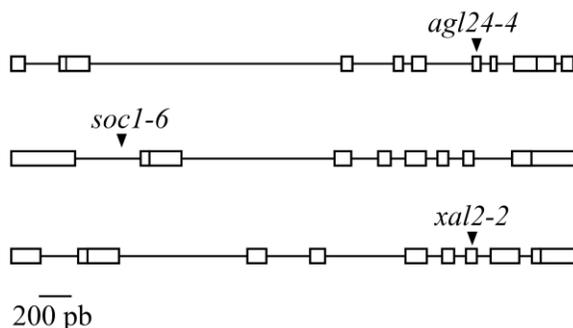


Figura 1. Modelo de la estructura de los alelos empleados (barra de escala= 200 pb). Los intrones están representados por líneas y los exones por rectángulos. Los sitios de inserción tanto del T-DNA para *AGL24* y *SOC1*, como del En-I transposón para *XAL2* se representan como triángulos.

3.1.1. Genotipificación

La verificación de las líneas genéticas se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento de la inserción y del gen mediante PCR de punto final (Cuadro 1). Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis a 100 V en geles de agarosa al 1% para identificar las bandas correspondientes a los genes o a las inserciones.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la genotipificación de las líneas genéticas.

Alelo	Nombre y secuencia del oligonucleótido (5'→3')
<i>agl24-4</i>	<i>AGL24-F</i> Kim: TCCATCGAAGTCAACTCTGCTGGATC
	<i>AGL24-R</i> Kim: GTCTTCATGCAAGTAACATCAAC
	GK-TDNA: CCCATTTGGACGTGAATGAATGTAGACAC
<i>soc1-6</i>	Salk_138131 F: GGAGCTGGCGAATTCATAAAG
	SALK_138131 R: AAGCAGAGAGAGAAGAGACGAGTG
	LBb1: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
<i>xal2-2</i>	AGL14MPE F: TGTAACGTTTACATTGTAAGCG
	AGL14MPE R: GCTGATTTATGTTCTCAATTCT
	EN8130: GAGCGTCGGTCCCCACACTTCTATAC

3.2. Producción de semillas y condiciones de crecimiento inicial

Las semillas se obtuvieron a partir de ocho plantas madre de cada línea genética. Las semillas se desinfectaron y escarificaron durante cinco minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 60% y 0.02% de Tween 20, fueron enjuagadas tres veces con agua bidestilada estéril. Posteriormente, las semillas se dejaron estratificando en agua destilada en oscuridad a 4°C durante 2 días. Finalmente fueron sembradas en cajas Petri (11 x 11 x 1 cm) con medio estándar que contiene sales MS (Murashige y Skoog, 1962) 0.2X (MP biomedical), 0.5 g/l MES, sacarosa 1% y agar 1%, con un pH de 5.6 ajustado con KOH. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de crecimiento vertical, con un fotoperíodo de día largo (16 h luz/ 8 h oscuridad), con luz blanca y fría a una intensidad de 110 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y a una temperatura que en la cámara de crecimiento oscilaba entre 20-26.5 °C con una 44-90 HR%.

Después de 15 días de crecimiento, las plantas madre se trasplantaron de las cajas Petri a macetas con sustrato Metro Mix 200. Las plantas fueron cultivadas hasta la producción y maduración de los frutos en un cuarto de crecimiento con luz blanca y fría a una intensidad de 110 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperíodo de día largo y condiciones óptimas de riego para la obtención de semillas.

3.3. Tratamientos

3.3.1. Inducción de estrés osmótico

Después de 5 días de crecimiento en cajas Petri, en las condiciones antes mencionadas, las plántulas fueron trasplantadas a cajas con el mismo medio de cultivo (tratamiento control: $\Psi_0 = -0.22 \text{ MPa}$); y a cajas de Petri con el mismo medio, pero suplementado con manitol a una concentración de 300 mM (tratamiento de estrés osmótico: $\Psi_0 = -0.85 \text{ MPa}$) el cual fue agregado al medio antes de ajustar el pH. Las plántulas se mantuvieron en crecimiento vertical y se obtuvieron 12 tratamientos factoriales, resultado de la multiplicación de las seis líneas genéticas por los dos tratamientos.

3.3.2. Tratamientos con ácido abscísico y fluridona

De igual manera, después de 5 días de crecimiento en las condiciones iniciales, las plántulas fueron trasplantadas a cajas Petri con el mismo medio de cultivo (tratamiento control); y a cajas Petri con el mismo medio adicionado con las concentraciones indicadas de ácido abscísico (tratamiento de ABA) o fluridona. El ABA fue disuelto en NaOH 1N y la fluridona en etanol al 100%.

3.4. Variables evaluadas

3.4.1. Medición del Potencial osmótico (Ψ_o)

El potencial osmótico del medio (Ψ_o) se determinó a partir de la medición de osmolaridad de 10 μ l en un osmómetro de presión de vapor (Vapro, Modelo-5520, Wescor Inc.), a una temperatura ambiental de 20 °C, de acuerdo con la ecuación de J. H. van't Hoff (Taiz y Zeiger 2010):

$$\Psi_o = -cRT \text{ [MPa]}$$

en donde:

Ψ_o = potencial osmótico; c = concentración de solutos (mol); R = constante general de los gases (0.00831 kg MPa mol⁻¹ K⁻¹) y T = temperatura absoluta (°K).

3.4.2. Evaluación del crecimiento en longitud de la raíz primaria

La longitud de la raíz primaria de plantas individuales fue marcada cada 24 h en la caja de crecimiento a partir del trasplante a los tratamientos. Al final del experimento, la caja fue registrada con un escáner y la longitud de cada raíz se midió con el programa ImageJ.

3.4.3. Análisis celular de las zonas de crecimiento de la raíz primaria

El análisis de las cuantificaciones celulares y el tamaño de las células completamente alargadas de la raíz primaria fueron caracterizadas en plántulas con uno y dos días post trasplante (dpt) al tratamiento control o al tratamiento con manitol. Para este análisis, las plántulas fueron fijadas y teñidas; lo cual consistió en sumergir a las plántulas completas en una solución de 50% metanol y 10% ácido acético durante 5 h para posteriormente ser enjuagadas en agua destilada. Enseguida fueron incubadas en 1% de ácido periódico a 37°C por 50 min y enjuagadas con agua destilada. Posteriormente se sumergieron en reactivo de Schiff (metabiosulfito de sodio 100 mM y ácido hidroclicórico 0.15 N) suplementado con 100 μ g/ml de yoduro de propidio durante 50 min. Se eliminó la solución anterior y se añadió una solución de DMSO 2% y glicerol al 30% durante 72 h. Finalmente las raíces se montaron en portaobjetos con una solución GDTY (20 ml de glicerol al 65%, DMSO 2%, con 0.04 g de tiosulfito de sodio y 17 g de yoduro de sodio). La raíz primaria de cada plántula fue fotografiada por secciones en un microscopio de interferencia de contraste diferencial (DIC), marca Olympus BX60, con un objetivo 40x, siguiendo una línea de células corticales, desde el centro quiescente hasta la zona de diferenciación. Posteriormente, se midió la longitud de cada célula cortical usando el programa ImageJ. Los resultados de las células de

cada plántula se analizaron con el algoritmo de cambio de estructura múltiple, mediante el programa MSC_analysis, de acceso libre en el sitio web www.ibiologia.com.mx/MSC_analysis, para determinar el número de células y la longitud de las zonas de crecimiento (Pacheco-Escobedo et al., 2016).

3.4.4. Análisis de la abundancia de proteínas

Para la extracción de proteínas se emplearon, aproximadamente, 3000 plántulas de 6 días de edad (por gramo de tejido), cultivadas en el medio MS descrito anteriormente, de las cuales se recolectó únicamente el ápice (1 cm) de la raíz primaria y congelado inmediatamente en nitrógeno líquido y mantenidas a -70°C hasta ser utilizadas.

3.4.4.1. Extracción de proteínas totales

Para la extracción de las proteínas totales de la raíz de plántulas de *Arabidopsis* se utilizó el primer centímetro del ápice de la raíz primaria de plántulas de seis dps, cultivadas verticalmente en cajas Petri, en el medio MS antes descrito. La extracción se realizó con el método de Agrawal y Thelen (2009), modificado. Se recolectó un gramo de raíces de *Arabidopsis* y fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. A cada muestra se agregó 6 ml de fenol pH 8.8 y 4 ml de amortiguador de extracción pH 8.8 (Tris-HCl pH 8.8 (100 mM), EDTA (10 mM), sacarosa (900 mM) y 2-mercaptoetanol (0.4 %)). La muestra se trituró con un politrón (Ultra Turrax), en dos rondas de 1 min por muestra, lavando el aspa con agua destilada en cada cambio de muestra. Se centrifugó a 4000 rpm, durante 30 min, a 4°C. Posteriormente se tomó el sobrenadante a la cual se agregó 25 ml de acetato de amonio (100 mM en metanol). La proteína fue precipitada a -20°C durante 24 h y, luego ésta se centrifugó a 4000 rpm, por 30 min, a 4°C. Se decantó el líquido y se realizaron dos lavados con 5 ml de acetato de amonio (100 mM), dos con 5 ml de acetona (80 %), y dos con 5 ml de etanol (70 %), agitando en vortex y centrifugando a 4000 rpm, por 10 min, a 4°C entre cada lavado. Se dejó secar la pastilla durante 20 min y, posteriormente, se resuspendió en 400 µl de IEF, se transfirió a un microtubo (1.5 µl) y se centrifugó por 10 min a 14000 rpm para recuperar la fase superior en otro microtubo (0.5 µl).

3.4.4.2. Cuantificación de las proteínas extraídas

Para la determinación de la integridad y la cuantificación de las proteínas extraídas se empleó la electroforesis 1D de SDS-PAGE (12%) a 100 V y 40 mA durante 1 h, seguida de tinción con azul de Coomassie. El análisis densitométrico de la concentración de proteínas en las bandas se realizó con el programa Image Lab 5.2.1, utilizando como referencia 1 µg/µl de lisozima.

3.4.4.3. Isoelectroenfoque de proteínas totales

Se preparó una solución de 80 µl de muestra (con 328 µg de proteína), 3 µl de anfolitos y 135 µl de solución de extracción de isoelectroenfoque (IEF) compuesta por urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, triton X-100 2% y DTT 50 mM. Con dicha solución se hidrató la tira de gel IPG (gradientes de pH inmovilizados en tres diferentes rangos de pH: 3-10, 4-6 y 5-8) durante 10 min y posteriormente se cubrió con 1.5 ml de aceite mineral. Enseguida se realizó el isoelectroenfoque en un focalizador PROTEAN i12 IEF Cell (BIO RAD). El programa consistió en 12 h de hidratación, más 7 h de isoelectroenfoque que se realizó mediante un aumento gradual de voltaje hasta alcanzar 8000 V durante la primera hora y al mismo voltaje durante el tiempo restante.

3.4.4.4. Electroforesis 2D SDS-PAGE

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se realizó mediante una electroforesis bidimensional, en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, 12%), por lo que debían tener la misma cantidad de concentración de proteínas. Para ello, las tiras provenientes del isoelectroenfoque se lavaron tres veces en una solución de Tris-HCl pH 8,8 (50 Mm), urea (6 M), glicerol (30%), SDS (2%) y azul de bromofenol (0.05%), y luego se lavaron tres veces en la solución más iodoacetamida, dejándose en agitación durante 15 min después de cada lavado. Posteriormente se preparó el gel de poliacrilamida con 30 ml de gel separador y 3 ml de gel condensador. Una vez solidificado el gel, se colocaron las tiras y el marcador molecular en los carriles correspondientes, y se vertió agarosa al 1% para sellar el gel. La electroforesis se realizó en un buffer compuesto de Tris-HCl (25 mM), glicina (192 mM) y SDS (0.1%) a 50 V por 22 h. Finalmente, los geles fueron teñidos con solución coomassie colloidal brilliant blue (800 ml de etanol, 3.2 g de brilliant blue G-250, 64 ml de ácido fosfórico, 320 g de sulfato de amonio para preparar 4 litros en agua destilada).

Las imágenes de los geles fueron capturadas en un escáner de alta resolución (GS-900 Calibrated Imaging Densitometer; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se analizaron con los programas Image Lab 5.2.1 y para el análisis global, los puntos fueron detectados, cuantificados y marcados con el programa PDQuest 8.1 (Bio-Rad). Para compensar la variabilidad en el teñido de los geles, el volumen de cada punto fue normalizado como un volumen relativo y únicamente los puntos que mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el análisis de t-student fueron considerados para su posterior análisis.

3.4.4.5. Identificación de proteínas por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

La identificación de las proteínas a partir del gel 2D SDS-PAGE se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, de la Facultad de Química de la UNAM. Para lo cual primero las proteínas seleccionadas se cortaron en fragmentos más pequeños y se destiñeron con 50% de metanol (v/v) y 5% de ácido acético (v/v) por 12 horas. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se incubaron por 15 minutos, dos veces en 100 mM de bicarbonato de amonio. Se redujeron en 50 mM DTT durante 45 minutos y se alquilaron con iodoacetamida 30 mM durante 2 horas. Posteriormente se lavaron 3 veces con 100 mM de bicarbonato de amonio. Se deshidrataron completamente con 100% de acetonitrilo. La digestión en el gel fue llevada a cabo con 30 μ l de tripsina de porcino modificada de una solución que contiene 20 ng/ μ l y se incubaron por 18 horas a 37 °C. Los péptidos fueron extraídos con 50% acetonitrilo (v/v) y 5% de ácido fórmico (v/v) en sonicación y deshidratados totalmente. Los péptidos se resuspendieron en 20 μ l de ácido fórmico al 1% (v/v), fueron desalados y concentrados por Ziptip C18 y eluidos en 12 μ l de fase móvil (97% agua 3% acetonitrilo 0.1% de ácido fórmico) Se realizó un análisis LC-MS / MS de mezclas de péptidos digeridos utilizando una trampa Agilent 1100 LC / MSD Trap XCT (Agilent Technologies). Para la identificación de los péptidos por espectrometría de masas en un espectrómetro Modelo Synapt G2S, (WATERS). Los péptidos identificados fueron contrastados contra la base de datos de Arabidopsis de UNIPROT.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comparación de los perfiles de expresión transcripcional de *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* en la raíz de *Arabidopsis*.

Con el fin de comparar visualmente el patrón anatómico transcripcional de *AGL14/XAL2*, *AGL24* y *SOC1* se analizaron los microarreglos Affymetrix del genoma completo de *Arabidopsis* ATH1 disponibles actualmente (Redman et al., 2004). El análisis se realizó mediante GENEVESTIGATOR, una herramienta de minería de datos para microarreglos públicos, disponible en <https://www.genevestigator.ethz.ch> (Zimmermann et al., 2004). Es importante mencionar que los datos de microarreglos disponibles fueron generados a partir de muestras de plantas en diversos estados de desarrollo, condiciones ambientales y medios de crecimiento i.e. agar, hidroponia o sustrato.

Los patrones espaciales de expresión transcripcional de *AGL24* y *SOC1* en la raíz primaria de *Arabidopsis* son similares a los de *XAL2*. El análisis de datos de microarreglos muestran que el mayor nivel de expresión y de coexpresión de *XAL2* y *SOC1* ocurre en las raíces laterales (Figura 2). De manera contrastante, *AGL24* muestra el menor nivel de expresión en las raíces laterales y en la raíz total. No obstante, en la raíz primaria, *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* muestran un patrón de expresión transcripcional muy similar, con niveles entre bajos y medios de expresión (Figura 2). En la raíz primaria *AGL24* presentó la mayor expresión, mientras que *XAL2* presentó la menor, y *SOC1* tuvo una expresión intermedia. En el eje longitudinal de la raíz primaria, se observa que la expresión de cada uno de estos MADS-box casi no difiere entre zonas. Se puede identificar que en el meristemo apical de la raíz *AGL24* y *SOC1* presentan el mayor nivel de expresión. Además, es en el meristemo apical donde se observa la mayor diferencia de expresión entre *AGL24* y *SOC1* con respecto a *XAL2*. De forma que, *XAL2* presenta la menor expresión en el meristemo apical, mientras que presenta la mayor expresión en la zona de elongación. En la zona de elongación y en la zona de diferenciación los tres MADS-box presentan un patrón muy similar (Figura 2).

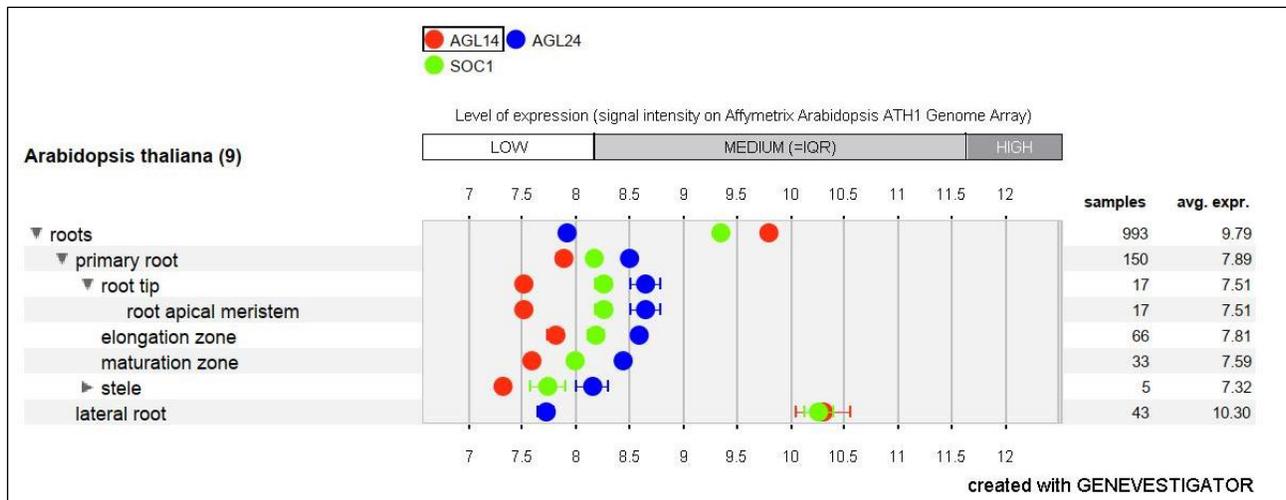


Figura 2. Los patrones de expresión de *SOC1* y *AGL24* concuerdan con los de *XAL2* en las diferentes zonas de crecimiento de la raíz primaria. Los datos fueron obtenidos mediante la herramienta Genevestigator de experimentos llevados a cabo con microarreglos (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>; Zimmermann et al., 2004).

4.2. Caracterización del crecimiento de la raíz primaria de *AGL24* y *SOC1*, y su interacción genética con *XAL2* en respuesta al estrés osmótico

4.2.1. Longitud de la raíz primaria

En esta sección buscamos establecer tres cosas: en primer lugar, si los factores de transcripción MADS-box tipo II *AGL24* y *SOC1* están implicados en la regulación del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*; en segundo lugar, si *AGL24* y *SOC1* presentan interacciones genéticas con *XAL2* en el crecimiento de la raíz primaria; en tercer lugar, si dichas interacciones genéticas se alteran en condiciones de estrés osmótico. Para cumplir con estos objetivos, caracterizamos el fenotipo de la raíz primaria de las mutantes sencillas *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2*, comparando su longitud con respecto al de las plantas tipo silvestre (Col-0 de aquí en adelante). También se determinó el crecimiento de la raíz primaria de las mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* de plántulas de *Arabidopsis*, y se comparó con respecto a sus parentales; tanto en condiciones óptimas de crecimiento, en un medio de cultivo con alta disponibilidad de agua, como en estrés osmótico severo, provocado por una baja disponibilidad de agua en el medio generado.

La estrategia experimental que planteamos para la realización de este trabajo es cultivar las plantas en medio de cultivo sólido con sales MS 0.2X adicionado con manitol (300 mM), con el fin de modificar el potencial osmótico del medio. La presencia de moléculas con actividad osmótica,

como el manitol, disminuye la disponibilidad del agua para las plantas mimetizando la sequía e induciendo déficit hídrico a nivel celular. En estas circunstancias, las plantas exhiben respuestas típicas del estrés hídrico incluyendo la alteración en el crecimiento y la expresión de genes de respuesta a estrés (Christensen y Feldmann, 2007). El manitol es utilizado para evaluar la respuesta de las plantas ante condiciones de estrés osmótico ya que es un soluto que no es fácilmente absorbido por las raíces, y a su vez disminuye el potencial osmótico del medio (Déjardin et al., 1999; Fu et al., 2019; Jang et al. 2007; Martínez et al. 1991).

El estrés osmótico severo se consiguió disminuyendo el potencial osmótico (Ψ_o) del medio de cultivo de -0.22 a -0.85 MPa, mediante la adición de manitol (de 300 mM; ver métodos), un azúcar no metabolizable que actúa como soluto no-iónico. El potencial osmótico de -0.85 MPa representa un estrés severo para plántulas silvestres de *Arabidopsis* (Bhaskara et al., 2015; Deak et al., 2005; van der Weele et al., 2000) y experimentos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la concentración de 300 mM no inhibe por completo el crecimiento de la raíz, por lo que esta concentración se ha empleado para detectar diferencias en la respuesta al estrés entre diferentes genotipos y accesiones de *Arabidopsis* (Cajero-Sánchez, 2018; Romero-Yahuitl, 2018). Para evaluar las diferencias en la longitud de la raíz primaria, plántulas con 5 dps de edad se transfirieron al tratamiento control (medio MS 0.2X) o al tratamiento de estrés hiperosmótico (medio MS 0.2X + manitol 300 mM) y durante los seis días posteriores se midió el aumento en la longitud de la raíz cada 24 h (Figura 3). Se analizó estadísticamente la longitud de la raíz primaria a los seis días de tratamiento (Cuadro 2 y Figura 4). El ANOVA de dos vías indicó que hay diferencias altamente significativas en la longitud de la raíz primaria entre genotipos ($P < 0.0000$) y entre los tratamientos ($P < 0.0000$), además indica que hay interacción estadística entre genotipos y tratamientos ($P < 0.0000$). Por lo cual, posteriormente se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias Tukey 0.05 (Figura 4B).

***AGL24* y *SOC1* son supresores del crecimiento de la raíz primaria.** Nuestras mediciones muestran que, en el medio de cultivo con un $\Psi_o = -0.22$ MPa (condiciones control) la raíz primaria Col-0 (planta silvestre) creció en longitud 6.37 ± 0.11 cm en seis días de experimento. Así mismo, la raíz de las mutantes sencillas de *agl24-4* presenta una longitud igual al de las plantas silvestres en el mismo período (Figura 3). En cambio, la longitud de la raíz primaria de las mutantes *soc1-6* fue ligeramente mayor (6%) y estadísticamente distinta que la longitud de las plantas tipo silvestre (Figura 4). Lo cual indica que *AGL24* solo no tiene un efecto sobre el crecimiento de la raíz primaria, mientras que *SOC1* tiene un efecto de supresor. Por otro lado, cabe mencionar que las mutaciones

sencillas en *agl24-4* y en *soc1-6* inducen un aumento visible en el crecimiento de las raíces laterales, aunque en este trabajo no se cuantificaron (Figura 4A).

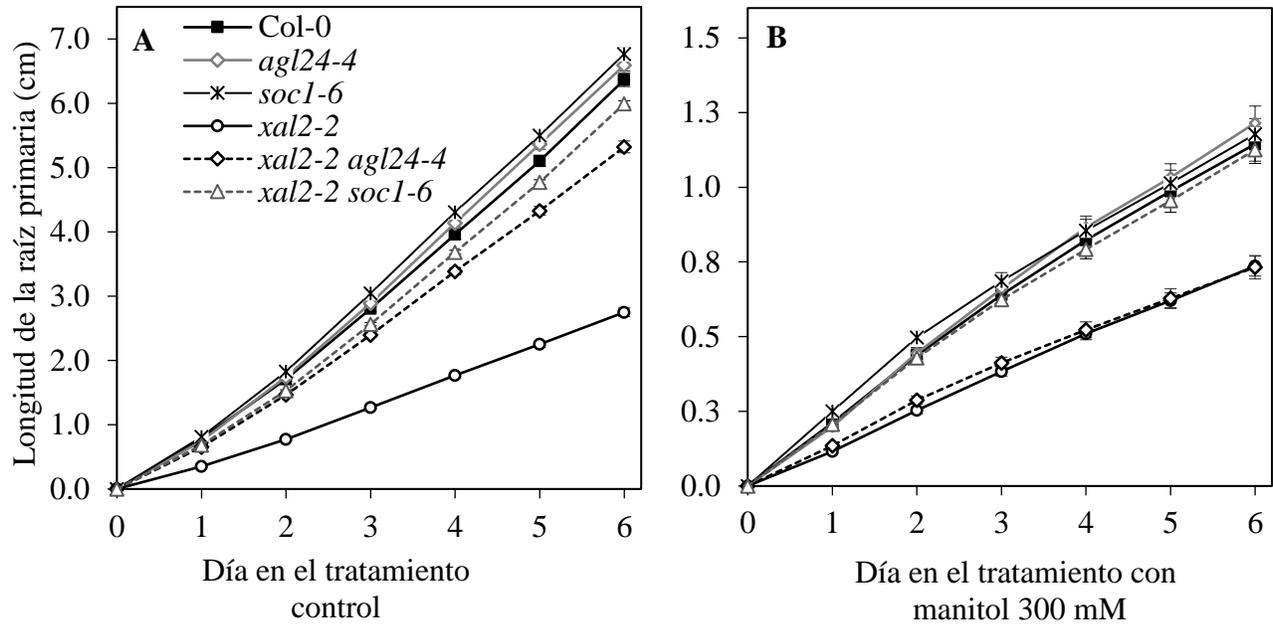


Figura 3. AGL24 y SOC1 son represores del crecimiento de la raíz, actuando de manera opuesta a XAL2. Longitud de la raíz primaria (cm) de plántulas de Arabidopsis con pérdida de función de los diferentes alelos de los genes MADS-box señalados. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps (días post siembra) a medio MS (0.2X) **A)** control o **B)** con manitol (300 mM), para su crecimiento durante un período de 6 días. Los datos son la media \pm EE ($n \approx 30$ por réplica experimental) de tres réplicas experimentales independientes con tres cajas Petri por réplica y 10 plantas por caja.

Las mutantes de *xal2-2* exhibieron una raíz primaria mucho más pequeña que la de las plantas silvestres Col-0 (57%; Figura 3A y Figura 4), esta observación concuerda con lo reportado por Garay-Arroyo et al. (2013). De manera interesante, las mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* y de *xal2-2 soc1-6* presentaron una raíz de tamaño intermedio y estadísticamente diferente al de las parentales (Figura 3A y Figura 4). Además, Pérez-Ruiz et al. (2015) reportan una regulación positiva de XAL2 sobre la expresión de AGL24 en la parte aérea, mientras que AGL24 no regula a XAL2; ya que plántulas mutantes de *xal2-2* de 14 dps presentaron afectaciones en los niveles de expresión de AGL24, pero no viceversa.

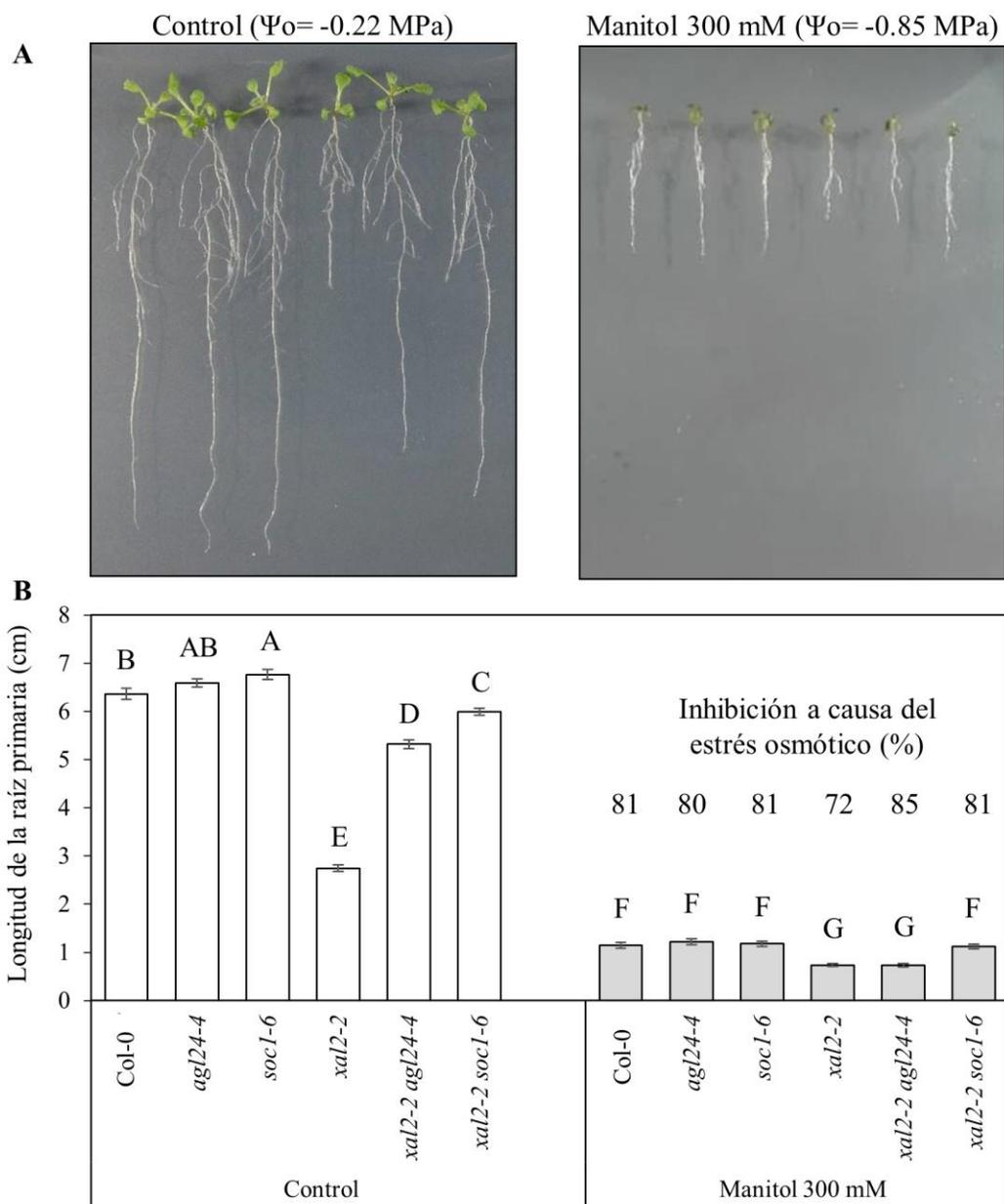


Figura 4. La mutación doble de *XAL2* y *AGL24* causa un incremento en la sensibilidad a la sequía en la raíz primaria comparado con la mutación sencilla de cada gen. (A) Plántulas de *Arabidopsis* y (B) longitud de la raíz primaria (cm) a seis días de tratamiento con manitol 300 mM. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) de 5 dps fueron transferidas a medio MS (0.2X) control o medio MS (0.2X) con manitol 300 mM, para su crecimiento durante 6 días. Los datos son la media \pm EE ($n = 30$ por réplica experimental) de tres réplicas experimentales independientes, con tres cajas Petri por réplica y 10 plantas por caja. Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de comparación múltiple de medias Tukey (0.05).

La raíz primaria de *xal2-2 agl24-4* y de *xal2-2 soc1-6* fue significativamente más pequeña (16% y 6%, respectivamente) que la raíz de las plantas silvestres y, además, 19% y 11%, respectivamente, más pequeñas que los parentales *agl24-4* y *soc1-6* (Figura 4A). Estos fenotipos intermedios sugieren que el efecto de *AGL24* y *SOC1* en el crecimiento de la raíz primaria es opuesto y, por lo menos parcialmente, independiente al de *XAL2*. Por lo que, posiblemente no actúen en la misma vía, sino que convergen, regulando blancos comunes de forma opuesta a través de la misma red de regulación genética para mediar el balance en el crecimiento de la raíz primaria.

El estrés osmótico severo afectó dramáticamente el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*. La disminución del potencial osmótico en el medio de cultivo, mediante la adición de 300 mM de manitol ($\Psi_o = -0.85$ MPa), ocasionó una inhibición dramática en el crecimiento de la raíz primaria (Figura 3B y Figura 4). Como resultado, después de seis días de exposición al estrés, la longitud de la raíz primaria de las plantas silvestres fue 81% más pequeña que su control sin estrés (Figura 3).

***XAL2* está involucrado de manera positiva en la regulación del crecimiento de la raíz primaria en respuesta al estrés osmótico.** A su vez en estrés osmótico *xal2-2* presentó una raíz 72% más pequeña que en condiciones óptimas. Lo anterior denota una menor sensibilidad al estrés osmótico en mutantes de *xal2-2* versus las silvestres (Figura 4). Cabe resaltar que, como la raíz de *xal2-2* es más corta que la raíz de las plantas silvestres en condiciones control, la mejor manera de ver el efecto en condiciones de estrés osmótico es que se normalice el crecimiento de cada línea con respecto a su crecimiento en condiciones control (esta última tendría un 100% de crecimiento). No obstante, la diferencia en el tamaño de la raíz de *xal2-2* con respecto a la planta silvestre se redujo por efecto del estrés (57% en condiciones óptimas y 36% en estrés).

La mutante doble *xal2-2 agl24-4* presenta una inhibición mayor en el crecimiento de la raíz primaria a causa del estrés osmótico que sus parentales y que las plantas silvestres. La mutante *agl24-4* no presentó diferencias en el tamaño de la raíz en estrés osmótico (Figura 3B). En contraste, la doble mutante *xal2-2 agl24-4*, si es estadísticamente más sensible al estrés osmótico, en comparación con las parentales y las plantas silvestres (Figura 4A): a los seis días de tratamiento de estrés, la inhibición de la raíz de *xal2-2 agl24-4* fue del 85%; de tal forma que el tamaño de su raíz primaria resultó igual al observado en *xal2-2* (Figura 3B y Figura 4). Con base en lo anterior podemos decir que la regulación de *XAL2* sobre el tamaño de la raíz en condiciones control es independiente

de *AGL24*, pero la inhibición del crecimiento de la raíz de *AGL24* en estrés osmótico, no es independiente de *XAL2*.

Además, a pesar de que la longitud de la raíz primaria de *soc1-6* resultó estadísticamente igual que la de las plantas silvestres y no levemente mayor, como en el tratamiento control; el efecto del estrés en *soc1-6* fue proporcional al de las plantas silvestres (81% de inhibición por el estrés), (Figura 3A y B). Así mismo, *xal2-2 soc1-6* exhibió una inhibición proporcional a la de *soc1-6* y a la de las plantas silvestres. Es interesante, como la respuesta al estrés de *xal2-2 agl24-4* fue distinta a la de *xal2-2 soc1-6*, lo cual demuestra una interacción genética distinta entre *SOC1* y *XAL2* en estrés osmótico a la observada en condiciones control. En la parte aérea se ha demostrado que la interacción genética entre *SOC1* y *XAL2* varía dependiendo de las condiciones ambientales, particularmente del fotoperiodo; en día largo (16 h luz) *soc1-6* presenta mayor retraso en la transición a la floración y es epistático a *xal2-2*, mientras que en día corto (8 h luz) el efecto de cada uno es independiente (Pérez-Ruiz et al., 2015).

Nuestros resultados en conjunto sugieren que, en condiciones control, la mutación sencilla *agl24-4*, por sí misma no es suficiente para causar un fenotipo de represión del crecimiento de la raíz primaria, mientras que la mutación sencilla de *soc1-6* causa un fenotipo sutil, de crecimiento ligeramente mayor a la silvestre. Fue interesante observar que, los fenotipos de las mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* resultaron intermedios y estadísticamente distintos a los fenotipos de los parentales. La mutación de *SOC1* o *AGL24* aunada a la de *XAL2* permitió detectar que *SOC1* y *AGL24* tienen una función similar como represores del crecimiento. No obstante, *AGL24* parece tener una participación menor que *SOC1*. Además, *SOC1* y *AGL24* actúan de forma opuesta a *XAL2*, que está involucrado en la promoción del crecimiento de la raíz primaria.

Estos resultados descriptivos son novedosos e inesperados porque *AGL24* y *SOC1* se han asociado en mayor medida al comportamiento de meristemo apical del brote y no se había reportado que interactuara con genes que claramente están involucrados en la respuesta de la raíz primaria con *XAL2*. Además, estos resultados contrastan a lo observado en la parte aérea pues, en esa zona las mutantes de pérdida de función de *XAL2* tienen un fenotipo de floración tardía y las mutantes de sobreexpresión de *XAL2* tienen un fenotipo de floración temprana, similar al de *AGL24* y *SOC1*; mientras que en la raíz primaria la función de represores de crecimiento *AGL24* y *SOC1* es opuesta a la función de promotor de crecimiento de *XAL2*.

En nuestro laboratorio se encontró que, en la raíz, *XAL2* regula positivamente a *SOC1* mientras que *SOC1* regula negativamente a *XAL2* igual que en la parte aérea (Pérez-Ruiz et al., 2015; Zluhan-Martínez et al., datos no publicados). Además, algunos de los genes analizados por Zluhan-Martínez et al., (datos no publicados) que son regulados por *XAL2*, son regulados de forma opuesta por *SOC1*, como son *AGL19*, *AGL42*, *PIN1*, *PIN4*, *SVP/AGL22*, *TCP24*, *ATHB34*, *ATHB53*, *ARF9*, *ARF11*. Estos datos podrían explicar los fenotipos intermedios de la mutantes doble *xal2-2 soc1-6*.

Es interesante observar que las mutantes sencillas *agl24-4* y *soc1-6* no presentan un fenotipo dramático de crecimiento en condiciones control, mientras que las mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* sí. Se sabe que los genes MADS-box funcionan como dímeros para unirse al DNA y como tetrámeros para la activación transcripcional, por lo que la formación de complejos proteicos es necesaria para que se lleve a cabo su función (Egea-Cortines et al., 1999; Jetha et al., 2014; Melzer y Theißen, 2009b; Schwarz-Sommer et al., 1992; Theißen et al., 2018). Por ejemplo, el modelo emblemático del cuarteto floral en donde la combinatoria diferencial de la interacción de proteínas homeóticas (*AP1*, *AP3*, *PI*, *AG* y *SEP3*) da lugar a los diferentes órganos florales como los sépalos, pétalos, estambres y carpelos (Smaczniak et al., 2012b). Cabe resaltar que, estudios del interactoma de las proteínas de distintos miembros de la familia de proteínas con dominio-MADS han mostrado que el número de interacciones por proteína no es uniforme (Immink et al., 2002, 2012; Verelst et al., 2007). La gran mayoría de las proteínas presentan solo algunas interacciones con otras proteínas con dominio-MADS, como es el caso de *XAL2*; mientras que otras interactúan con muchas otras como en el caso de *SOC1* y *AGL24* (de Folter et al., 2005; Immink et al., 2009, 2012). En un ensayo que incluyó a más de cien *AGL*'s (de Folter et al., 2005), *XAL2* formó dímeros únicamente con *AGL16*, *AGL24*, *FUL* y *SOC1*; mientras que *AGL24* formó dímeros con 11 y *SOC1* con 24; de éstos, habría que confirmar *in vivo* la interacción de sus proteínas y asegurar que estén presentes en la misma célula al mismo tiempo para llevar a cabo una función en complejos multiméricos (de Folter et al., 2005). Adicionalmente, se sabe que las proteínas con dominio-MADS interactúan con proteínas de otras familias; por ejemplo, con proteínas remodeladoras de la cromatina (Brambilla et al., 2007; Liu et al., 2009; Smaczniak et al., 2012b; Sridhar et al., 2006).

En ese mismo sentido, nuestros resultados y los análisis del crecimiento de la raíz primaria de la mutante doble *agl24-4 soc1-6* obtenidos recientemente en nuestro laboratorio indican que *AGL24* y *SOC1* tienen una función redundante en este órgano, pues las mutantes dobles *agl24-4 soc1-6* presentan una raíz más larga que las plantas silvestres y que *soc1-6* (Patiño-Olvera, datos no

publicados). Lo anterior concuerda con la redundancia reportada en la transición a la floración entre *AGL24* y *SOC1*, en la cual en período de día corto, la mutante doble de *soc1-2 agl24-1* solo florece en presencia de giberelinas, y presentan un retardo en la floración mayor que las mutantes sencillas; sugiriendo que, *SOC1* y *AGL24* determinan sinérgicamente el tiempo de floración en condiciones de días cortos (Liu et al., 2008; Riboni et al., 2013). De manera interesante se ha demostrado que la interacción de las proteínas de *SOC1* con *AGL24* es determinante para que *SOC1* se mueva al núcleo y, junto con *AGL24*, lleven a cabo su actividad como factores de transcripción (Lee et al., 2008).

Nuestros resultados permiten suponer que, *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* están actuando en la misma red de regulación genética en la raíz, pero contrario a lo reportado en la parte aérea *AGL24* y *SOC1* actúan de forma opuesta a *XAL2* (Pérez-Ruiz et al., 2015). Por lo que es pertinente preguntarse si existen proteínas con dominio-MADS adicionales a *AGL24* y a *SOC1* que tengan una función redundante con ellos. Uno de nuestros candidatos podría ser *FRUITFULL (FUL)*, cuya mutante de pérdida de función *ful7* presenta un fenotipo similar al de *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* al ser cruzada con *xal2-2* tanto en la parte aérea (Pérez-Ruiz et al., 2015) como en la raíz primaria (Garay et al., datos no publicados). Por lo cual, también sería interesante caracterizar el crecimiento de la raíz primaria de la cruce triple de *agl24-4 soc1-6 ful7*. En cambio, proteínas con dominio-MADS con funciones similares a *XAL2* en el crecimiento de la raíz podrían ser *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* y *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, los cuales tienen una función opuesta a *AGL24* y *SOC1* en la parte aérea (Pérez-Ruiz et al., 2015). Por otro lado, un posible gene blanco de *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* podría ser *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, miembro de la familia de *FT/TFL1*. De manera interesante, *TFL1* es un gen represor de la longitud de la raíz primaria, cuyos mutantes de pérdida de función muestran raíces más largas que las plantas silvestres (Lachowiec et al., 2015). *TFL1* es regulado por *AGL24* y *SOC1* durante la especificación del meristemo floral, e incluso es regulado directamente por *XAL2* (Pérez-Ruiz et al., 2015). Por lo tanto, es probable que *TFL1* sea regulado por *AGL24*, *SOC1* y *XAL2* en la raíz.

En cuanto a la respuesta en estrés osmótico, *xal2-2* muestra una menor sensibilidad relativa al estrés en comparación con la planta silvestre; esto sugiere que la actividad de *XAL2* inhibe la respuesta de la raíz primaria ante el estrés osmótico. En condiciones óptimas, las mutantes de *xal2-2* muestran una disminución en la expresión de *PIN1* y alteraciones en el transporte y la concentración de auxinas en la raíz (Garay-Arroyo et al., 2013). Por lo tanto, es probable que la reducción de la expresión de *PIN1* y del transporte de auxinas en respuesta al estrés osmótico sea diferente en *xal2-2*, con respecto

a las plantas silvestres porque ya están reducidas a causa de la pérdida de función de *XAL2*. Lo anterior también podría explicar la leve insensibilidad al estrés en el crecimiento de la raíz primaria o a que *XAL2* inhibe algunos de los componentes de la respuesta a estrés osmótico (Figura 4).

Por otro lado, los resultados muestran que *SOCI* está involucrado en la supresión del crecimiento de la raíz primaria tanto en condiciones control, pero no en condiciones de estrés osmótico. No obstante, el fenotipo de la doble mutante *xal2-2 soc1-6*, sugiere que se necesita de *XAL2* para ver el efecto inhibitorio de *SOCI*.

De manera interesante, la respuesta al estrés de *xal2-2 agl24-4* fue distinta a la de *xal2-2 soc1-6* (Figura 3 y 4). Lo cual demuestra que la interacción genética de *AGL24* con *XAL2* es distinta de la interacción de *SOCI* con *XAL2*, en condiciones de estrés osmótico, en el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*. Por lo tanto, dichas interacciones son dinámicas y varían en función del potencial osmótico y de la disponibilidad de agua en el medio, ya que el efecto de *xal2-2 agl24-4* cambia en respuesta a estrés osmótico. Lo anterior permite suponer que, ante cambios severos de potencial osmótico, *AGL24* y *SOCI* podrían estar interactuando con *XAL2*, por lo que especulamos que *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* también pueden desempeñar un papel en el crecimiento de la raíz primaria en respuesta al estrés osmótico. Sería importante demostrar si el estrés osmótico afecta la expresión de *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* en plantas silvestres mediante RT-PCR y/o con líneas reporteras transcripcionales y traduccionales de dichos genes.

Con el fin de obtener información más precisa sobre la participación de *AGL24*, *SOCI* y su interacción genética con *XAL2* en la modulación del crecimiento de la raíz primaria en condiciones óptimas y en respuesta al déficit hídrico, consideramos importante evaluar su efecto sobre los procesos de proliferación y elongación celular en la zona de crecimiento de la raíz primaria, lo cual será abordado en la siguiente sección de este trabajo.

4.2.2. Bases celulares de la función de *SOCI*, *AGL24* y *XAL2* en la zona de crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*.

Trabajos previos han mostrado que la longitud de la raíz está determinada por el número de células en división y por el tamaño final en la zona de diferenciación, derivados de la combinación de dos procesos celulares fundamentales que ocurren en la zona de crecimiento de la raíz: la proliferación y la elongación celular (Beemster y Baskin, 1998; Tsukagoshi, 2016). Dichos procesos están separados espacialmente en zonas funcionales bien establecidas en la raíz primaria de *Arabidopsis*, lo cual hace

muy fácil su estudio. En la zona meristemática ocurre la división celular y el inicio de la expansión celular, mientras que en la zona de elongación ha cesado por completo la división celular y se produce la mayor expansión celular (Ivanov y Dubrovsky, 2013; Ubeda-Tomás et al., 2012; Verbelen et al., 2006).

Con el fin de conocer la función de *AGL24* y *SOC1* y su interacción genética con *XAL2* en los procesos de división y elongación celular, caracterizamos el patrón espacial celular dentro de la zona de crecimiento de la raíz, en mutantes sencillas de *xal2-2*, *agl24-4* y *soc1-6* y en mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* tanto en condiciones control como en respuesta a estrés osmótico. Para ello, transferimos plántulas de 5 dps de edad a cajas con medio MS 0.2X (control) o MS 0.2X con 300 mM de manitol (estrés osmótico) por 24 y 48 h. Cuantificamos el número y la longitud de cada una de las células de una hilera de la corteza, en el eje longitudinal de la raíz primaria, desde el centro quiescente hasta 10 células después de la aparición del primer pelo (Figura 5), mediante el programa ImageJ. De acuerdo a la definición previa, la célula cortical adyacente a la célula epidérmica que presentó el primer pelo fue considerada como el límite basípeto de la zona de elongación; mientras que se consideraron células del RAM a las células localizadas entre el centro quiescente y la zona de elongación (Ivanov y Dubrovsky, 2013). No obstante, datos recientes de nuestro laboratorio demuestran que, después del primer pelo todavía crecen las células, en ese artículo se sugiere que hay que contar 6 células después del primer pelo y contar 15-20 células para tener el tamaño de las células completamente alargadas (Cajero-Sánchez et al., 2017).

El número de células, la longitud del dominio de proliferación, dominio de transición del meristemo apical de la raíz y la zona de elongación fueron determinados mediante el algoritmo de cambio de estructura múltiple, de acceso libre en el sitio web www.ibiologia.com.mx/MS_analysis; el cuál estima el límite de los dominios y las zonas de la raíz mediante la función de dos puntos de quiebre de la librería “strucchange”, del programa estadístico R (Pacheco-Escobedo et al., 2016). Adicionalmente, para estimar la producción celular, medimos el flujo celular al final de la zona de elongación. El flujo celular fue estimado como la relación entre la tasa de crecimiento de la raíz primaria y la longitud de las 10 células a partir del primer pelo, para cada día (van der Weele et al., 2000). Finalmente, para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre los genotipos mutantes con respecto a las plantas tipo silvestre, realizamos una prueba t de student a cada una de las variables determinadas. Este enfoque provee un perfil detallado de los parámetros que influyen el crecimiento de la raíz (Beemster y Baskin, 1998; Ivanov y Dubrovsky, 2013).

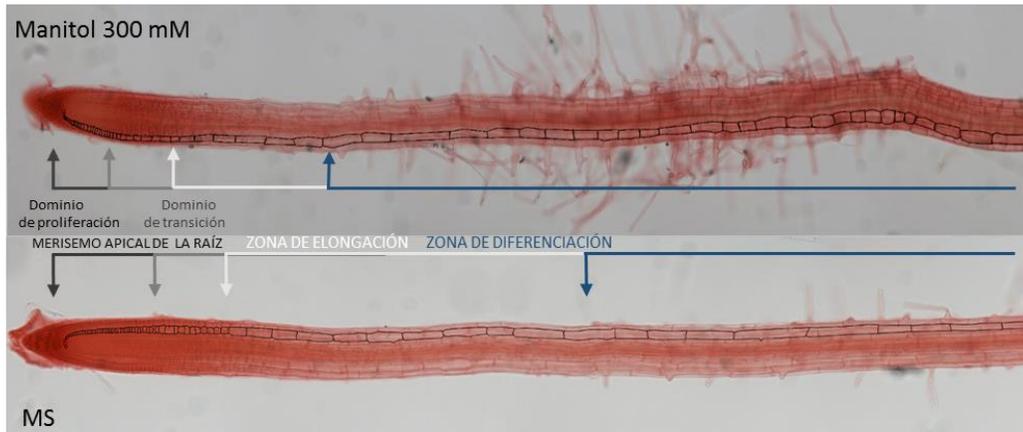


Figura 5. Disminución por efecto del estrés osmótico en el tamaño de los dominios del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz primaria de plántulas tipo silvestre (Col-0) de Arabidopsis. Microscopía óptica de interferencia de contraste diferencial (DIC) del ápice de la raíz primaria; se resalta el contorno de una hilera de células corticales. Las plantas fueron crecidas en condiciones control (MS 0.2X) hasta 5 dps y luego se trasladaron a las diferentes condiciones de crecimiento: control (MS 0.2X) y estrés osmótico (300 mM manitol) durante 24 h.

Para detectar los cambios a corto plazo en el número y longitud celular del RAM, graficamos la longitud de cada célula cortical en el eje longitudinal, a partir del centro quiescente hasta diez células después del primer pelo radical a las 24 y 48 h después del trasplante (Figura 5 y 6). Los perfiles de la longitud y posición de las células en el ápice de la raíz corresponden a una función sigmoide (Figura 6; Bizet et al., 2015) iniciando con un tamaño pequeño en las células más cercanas al centro quiescente, en el dominio de proliferación; pasando por una transición donde se produce un mayor crecimiento en la parte intermedia inferior; seguida de la típica progresión del tamaño, a medida que la posición de las células es más distante del centro quiescente; hasta llegar al tamaño final, en la zona de diferenciación (Figura 5 y 6).

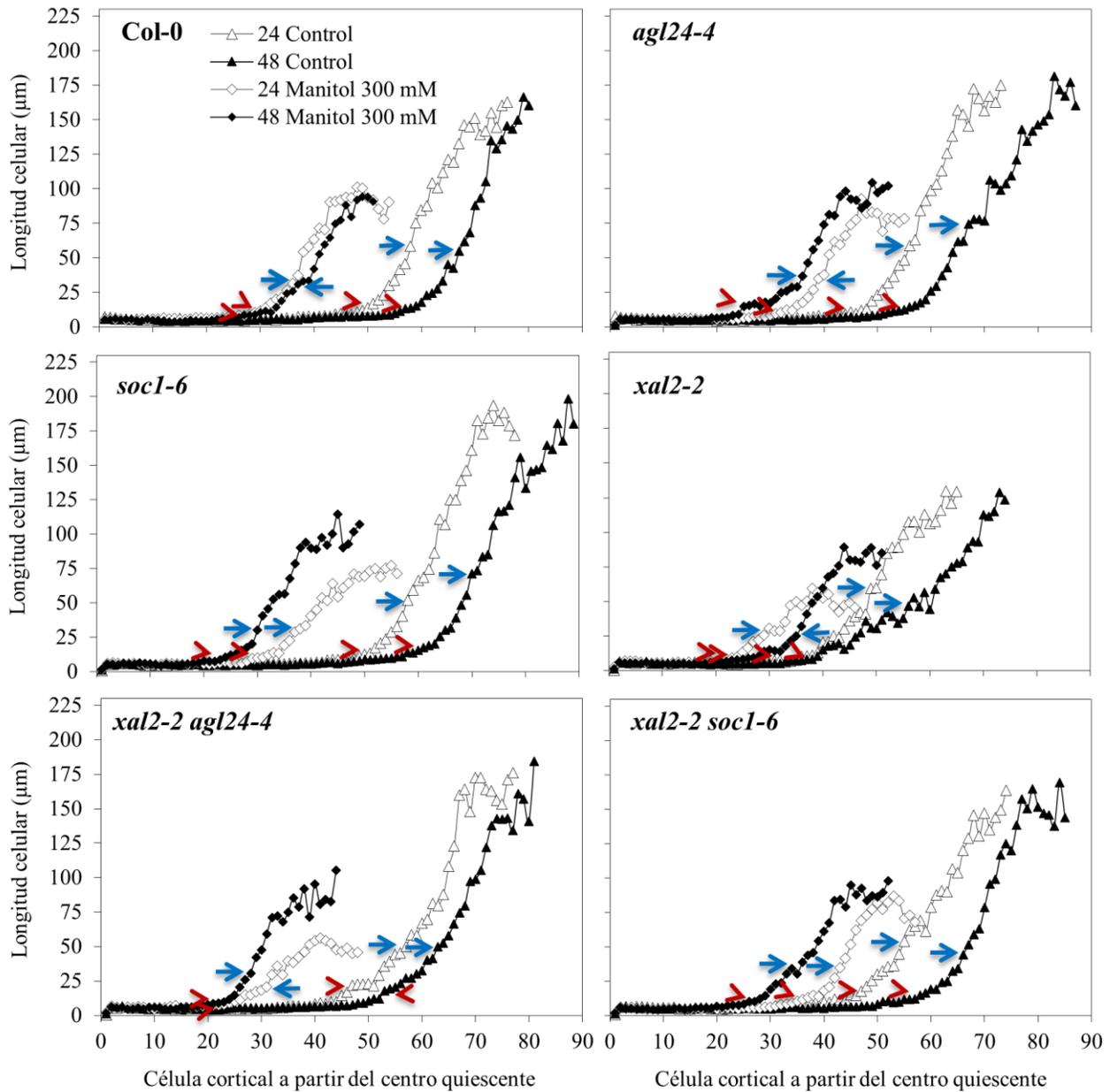


Figura 6. Longitud de las células corticales a partir del centro quiescente y hasta diez células del primer pelo radical de plántulas de *Arabidopsis* de los genotipos indicados, sometidas al tratamiento control (MS 0.2X) o de estrés osmótico (0.2X MS adicionado con 300 mM Manitol) en dos diferentes tiempos 24 h y 48 h. Las plantas fueron cultivadas en condiciones control (MS 0.2X) hasta 5 dps y luego se trasladaron a las diferentes condiciones de crecimiento: control y estrés osmótico (300 mM manitol) ($n = 10$). La punta de flecha marca la transición entre el dominio de proliferación y el dominio de transición; la punta de flecha indica la transición entre el dominio de transición y la zona de elongación.

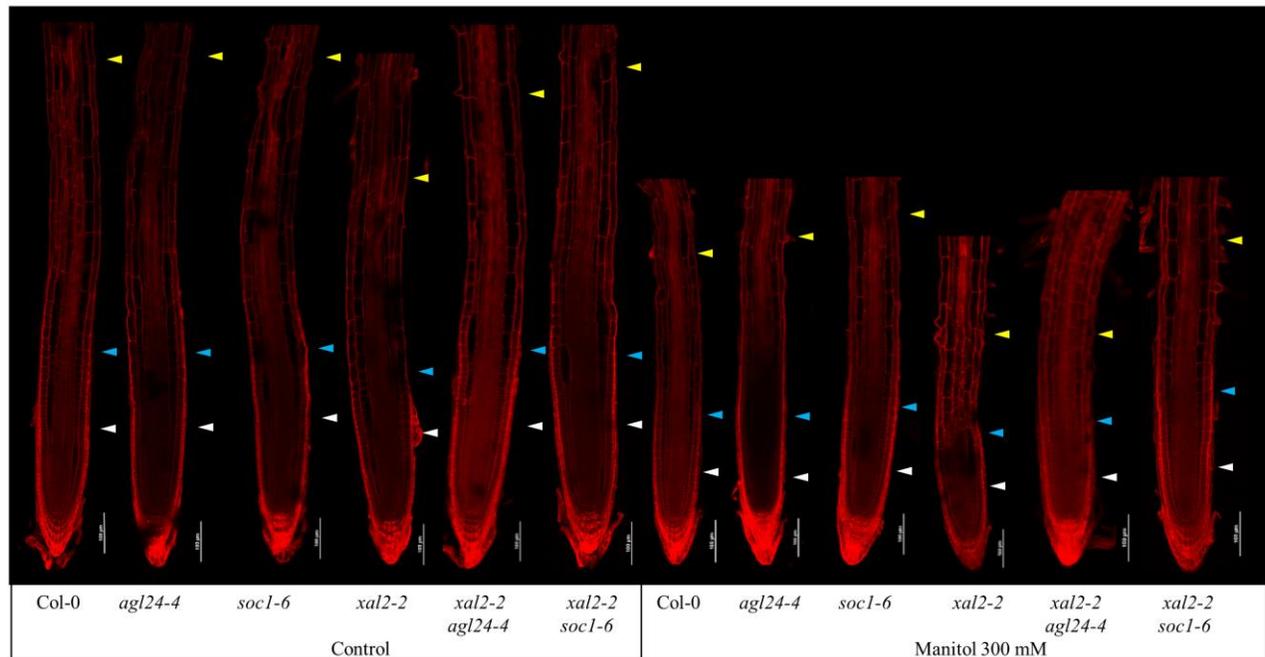


Figura 7. Cambios en el tamaño de los dominios del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz primaria en respuesta a estrés osmótico. Plántulas de *Arabidopsis* de los genotipos indicados, sometidas al tratamiento control (0.2X MS) o de estrés osmótico (300 mM Manitol) durante 24 h ($n = 10$). Las plantas fueron cultivadas en condiciones control (MS 0.2X) hasta los 5 dps y luego se trasplantaron a las diferentes condiciones de crecimiento: control y estrés osmótico (300 mM manitol). Se indica el límite basal con puntas de flecha blanca del dominio de proliferación, azul el dominio de transición y en amarillo la zona de elongación.

En Col-0, el tamaño del meristemo apical de la raíz primaria aumenta a través del tiempo debido a un incremento en el número de células en el dominio de proliferación. A las 24 h de trasplante, en condiciones óptimas de crecimiento, el meristemo apical midió 506 μm (que incluye los dominios de proliferación y de transición) y la zona de elongación 651 μm (Figura 8). Además, las células de la zona de elongación aportan la mayor parte de la longitud en la zona de crecimiento de la raíz conformada por el meristemo apical y la zona de elongación. Por otro lado, a pesar de que la producción celular se incrementa de las 24 a las 48 h, la diferencia no fue significativa (Cuadro 2). No obstante, el tamaño del meristemo se modifica con relación a la edad, puesto que, aumentó 13% ($P < 0.05$) de las 24 h a las 48 h post trasplante, es decir, de los seis a los siete dps de edad, respectivamente (Figura 8). Lo anterior se debió a un incremento proporcional (13%; $P < 0.01$) en el número de las células en el dominio de proliferación ya que el número de células en el dominio de transición no cambia (Figura 6 y Figura 9A). De manera similar a lo reportado por Dello Ioio et

al. (2007), en cuyas condiciones experimentales el número de células en el meristemo aumenta hasta que el día cinco post germinación (que representa al menos el día siete post siembra) comienza a ser constante. En cambio, la longitud de la zona de elongación y el tamaño de las células completamente elongadas en la zona de diferenciación no cambió por efecto de la edad, sino que permanecieron constantes (Figura 8 y Cuadro 2). La longitud de las células completamente elongadas depende de la longitud de las células que dejan el meristemo, el tiempo de residencia de las células en la zona de elongación y la tasa de expansión mientras están en la zona de elongación (West et al., 2004).

Lo anterior es consistente con lo reportado previamente por Tsukagoshi et al. (2010) y Ubeda-Tomás et al. (2009), cuyo resultados indican que durante los primeros días después de la germinación, el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* no es estable o continuo, sino acelerado, a causa del incremento del tamaño del meristemo apical de la raíz. La aceleración del crecimiento del meristemo depende del incremento del número de células en el meristemo y de la tasa de división celular, y además del retraso en la transición a la elongación (Beemster y Baskin, 1998). No obstante, se ha reportado que posteriormente el crecimiento de la raíz se vuelve constante, aunque la edad varía dependiendo de las condiciones experimentales. Por ejemplo, Ubeda-Tomás et al. (2009) y Hacham et al., (2011) reportan un crecimiento constante de la raíz primaria a los cinco o seis días post germinación, mientras que Beemster y Baskin (2000) reportan un crecimiento acelerado incluso a los 10 dps. El crecimiento constante es posible solamente cuando el número de células meristemáticas producidas por unidad de tiempo es igual al número de células que se desplazan a la zona de elongación (Ivanov y Dubrovsky, 1997). Esto quiere decir que, en el presente trabajo, en condiciones control, la medición celular se realizó en un momento en el que la raíz primaria de Col-0 exhibió un crecimiento acelerado, de 0.78 cm de las 0 a las 24 h después del trasplante, y de 93 cm de las 24 a las 48 h (Cuadro 2).

El estrés osmótico severo afecta el crecimiento de la raíz primaria reduciendo tanto la elongación como la división celular. El impacto del estrés osmótico en el tamaño de la zona de crecimiento, conformada por el meristemo y la zona de elongación tiene la misma tendencia que el impacto en el tamaño de la raíz primaria (Figura 4B, 7 y 8). En condiciones de estrés, a las 24 h de trasplante, el meristemo midió 290 μm y la zona de elongación 427 μm (Figura 8). Lo que significa que el aporte del meristemo en el tamaño de la zona de crecimiento disminuyó a causa del estrés; pues en condiciones óptimas el aporte del meristemo fue del 44%, mientras que la de la zona de elongación aportó el 56%; y en estrés osmótico el meristemo aportó el 40% del tamaño, mientras que

la zona de elongación el 60% (Figura 10). La zona de crecimiento apical disminuyó de un tamaño de un 1.1 mm a otro de 0.717 mm por efecto del estrés, constituyendo el 3% de la raíz primaria a los 6 dps de edad en esas condiciones (Figura 8).

El estrés osmótico severo inhibió el incremento en el número de células en el dominio de proliferación, de las 24 a las 48 h con respecto a lo que se observa en condiciones control. En plantas tipo silvestre, el meristemo fue 43% y 51% más pequeño a causa del tratamiento estrés osmótico durante 24 h y 48 h, respectivamente ($P < 0.001$ en ambos tiempos; Figura 10 y A1). Lo anterior indica que el impacto del estrés osmótico severo en el meristemo se acentuó con el tiempo de exposición. El impacto varía entre los dominios del meristemo, afectando más al dominio de proliferación que al de transición; puesto que, el número de células en el dominio de proliferación disminuyó drásticamente en el tratamiento de estrés con respecto al control (47% y 50%; $P < 0.001$ ambos; Figura A4). Además, de forma interesante, el número de células en el dominio de proliferación permaneció constante entre las 24 y las 48 h de estrés (Figura 6). En consecuencia, el estrés inhibió el incremento en el tamaño del meristemo, en contraste con lo observado en este estadio de desarrollo en condiciones control (Figura 6). Por otro lado, el número de células del dominio de transición aumentó a las 24 h del trasplante a condiciones de estrés osmótico (28%; $P < 0.05$) creciendo en manitol 300 mM (Figura 9A y A4). Además, la producción celular se redujo en 56% a causa del estrés osmótico en ambos tiempos (Cuadro 2). Por lo tanto, la disminución en el crecimiento de la raíz a causa del estrés osmótico está correlacionada con los cambios en la producción celular.

El estrés osmótico severo también afectó drásticamente el proceso de elongación celular. Las plantas silvestres expuestas a manitol 300 mM presentaron células más pequeñas en todas las zonas (Figura 9B y C, Cuadro 2). El tamaño máximo que alcanzan las células en el dominio de proliferación se redujo por efecto del estrés (17%; $P < 0.01$); mientras que el tamaño alcanzado por las células del dominio de transición a la zona de elongación fue afectado en mayor medida (50%; $P < 0.001$). Así mismo, las primeras células completamente elongadas después del primer pelo, en la zona de diferenciación, fueron 41% más pequeñas en condiciones de estrés ($P < 0.01$; Cuadro 2).

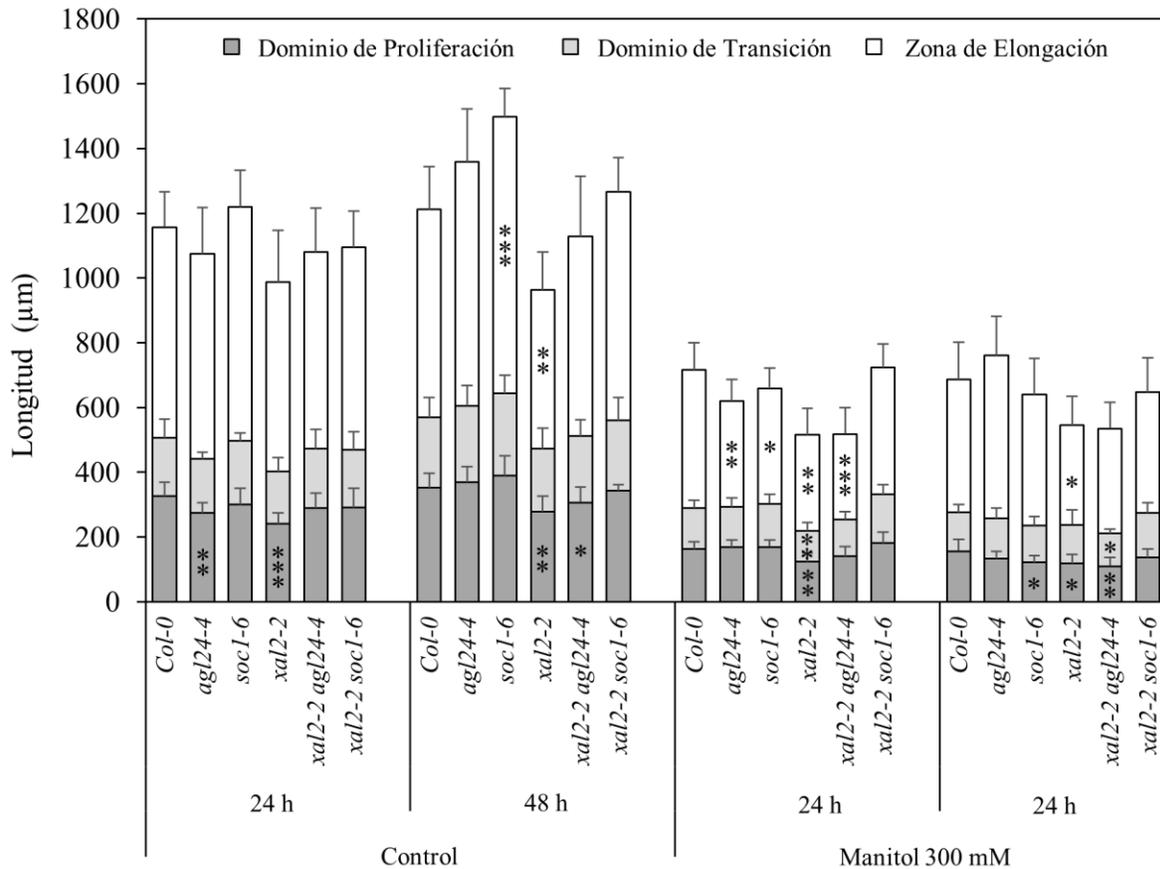


Figura 8. Longitud de la zona de crecimiento de la raíz primaria conformada por el meristemo apical (dominio de proliferación más dominio de transición) y la zona de elongación. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps a medio MS (0.2X) sin manitol (Control) o suplementado con manitol 300 mM, para su crecimiento durante 24 o 48 h. Los datos son la media \pm DE ($n = 10$). Se presentan las comparaciones pareadas de los genotipos mutantes contra Col-0 WT, en la prueba t de Student: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Además, las plantas en estrés presentaron una zona de elongación 34% más corta ($P < 0.01$), con respecto al control, a las 24 h (Figura 7, 8 y 10). La afectación en las anteriores cuatro variables permaneció constante de las 24 a las 48 h. El proceso de elongación es el que más aporta al tamaño de la raíz; sin embargo, el estrés osmótico afecta de manera proporcional a la elongación celular y al número de células en el meristemo. En trabajos pioneros, Beemster y Baskin (1998) observaron que la inhibición de la elongación celular es una respuesta inmediata al cambio de potencial osmótico y que el crecimiento de la raíz en cierto nivel de déficit hídrico, está determinado principalmente por el suministro de células en la zona de rápida elongación y las células en el dominio de proliferación.

El menor número de células en el meristemo se debe a que tiene un menor número de células en el dominio de proliferación y un menor tamaño, tanto en el dominio de proliferación como en el dominio de transición. Estos resultados concuerdan con lo establecido en la literatura en donde se ha demostrado que tanto el estrés osmótico como el iónico-osmótico afectan el tamaño del meristemo y el número de células (Beemster y Baskin, 1998; Dinneny et al., 2008; Rowe et al., 2016; van der Weele et al., 2000).

Cuadro 2. Longitud de las células corticales completamente elongadas, tasa de producción celular y tasa de crecimiento de la raíz primaria. Las plántulas de *Arabidopsis* fueron cultivadas en medio MS desde el día 0 hasta el día 5 y posteriormente trasplantadas a: MS (control = C) o MS + manitol 300 mM (estrés = M) durante 24 o 48 h.

		Longitud de las células corticales completamente elongadas (μm)					
Horas de tratamiento	Col-0	<i>agl24-4</i>	<i>soc1-6</i>	<i>xal2-2</i>	<i>xal2-2 agl24-4</i>	<i>xal2-2 soc1-6</i>	
24 C	162 \pm 19	179 \pm 16 *	178 \pm 19	121 \pm 13 ***	166 \pm 15	148 \pm 22	
48 C	167 \pm 20	182 \pm 17	178 \pm 23	120 \pm 10 ***	157 \pm 14	157 \pm 21	
24 M	95 \pm 15 ***	86 \pm 13 ***	78 \pm 20 *, ***	51 \pm 16 ***, ***	47 \pm 8 ***, ***	76 \pm 7 **, ***	
48 M	92 \pm 14 ***	99 \pm 17 ***	95 \pm 18 ***	82 \pm 11 ***	91 \pm 12 ***	98 \pm 13 ***	
		Tasa de producción celular (células d^{-1})					
0-24 C	48 \pm 4	42 \pm 2	45 \pm 3	29 \pm 2 *	39 \pm 2	46 \pm 1	
24-48 C	55 \pm 5	54 \pm 4	57 \pm 4	35 \pm 3 *	52 \pm 3	54 \pm 2	
0-24 M	21 \pm 4*	22 \pm 3*	30 \pm 7	21 \pm 5	26 \pm 5	26 \pm 3*	
24-48 M	23 \pm 6*	23 \pm 5*	24 \pm 6*	16 \pm 2*	15 \pm 4**	22 \pm 3**	
		Tasa de crecimiento de la raíz primaria (cm d^{-1})					
0-24 C	0.78 \pm 0.14	0.75 \pm 0.10	0.81 \pm 0.16	0.35 \pm 0.07***	0.65 \pm 0.08***	0.68 \pm 0.11	
24-48 C	0.93 \pm 0.17	0.99 \pm 0.18*	1.02 \pm 0.16***	0.42 \pm 0.10***	0.81 \pm 0.12***	0.84 \pm 0.15**	
0-24 M	0.21 \pm 0.10***	0.20 \pm 0.08***	0.25 \pm 0.10**, ***	0.12 \pm 0.07***, ***	0.13 \pm 0.07***, ***	0.21 \pm 0.07***	
24-48 M	0.23 \pm 0.13***	0.25 \pm 0.12***	0.25 \pm 0.11***	0.14 \pm 0.09***, ***	0.16 \pm 0.09***, ***	0.22 \pm 0.09***	

Los datos son la media \pm DE ($n = 10$), seguidos de la prueba de t-student de cada genotipo contra Col-0 (asteriscos en negro) y del tratamiento de manitol contra el control (asteriscos en rojo), donde: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

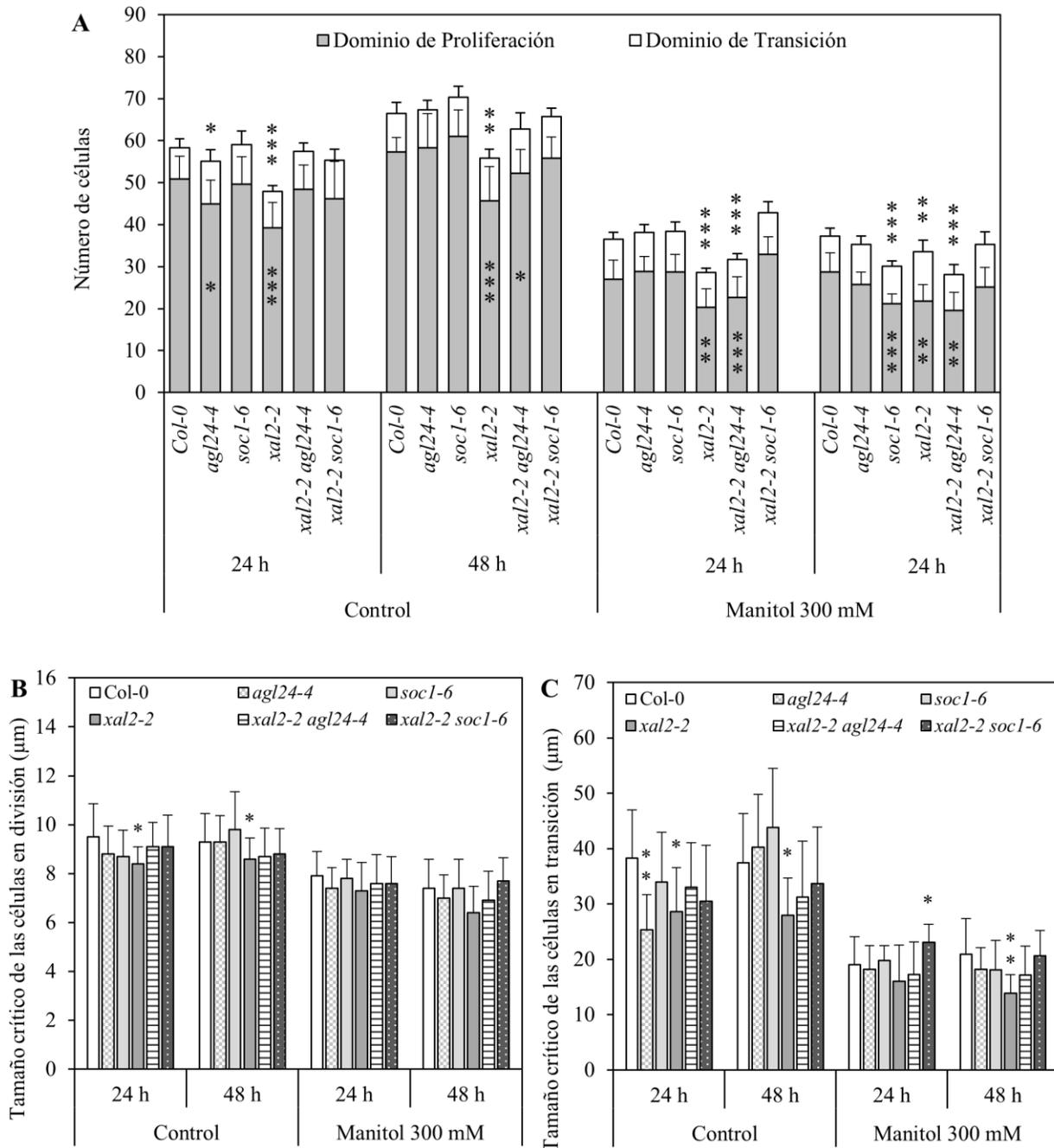


Figura 9. A) Número de células en el dominio de proliferación y en el dominio de transición. B) Longitud crítica de las células en que transitan del dominio de proliferación al dominio de transición. C) Longitud crítica de las células que transitan del dominio de transición a la zona de elongación. Las plántulas se cultivaron en medio MS (0.2X) y a los 5 dps se transfirieron a medio MS (0.2X) sin manitol (Control) o suplementado con manitol 300 mM, para su crecimiento durante 24 o 48 h. Los datos son la media \pm DE ($n = 10$). Se presenta el análisis comparativo de genotipos mutantes versus Col-0 WT en la prueba t de Student: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

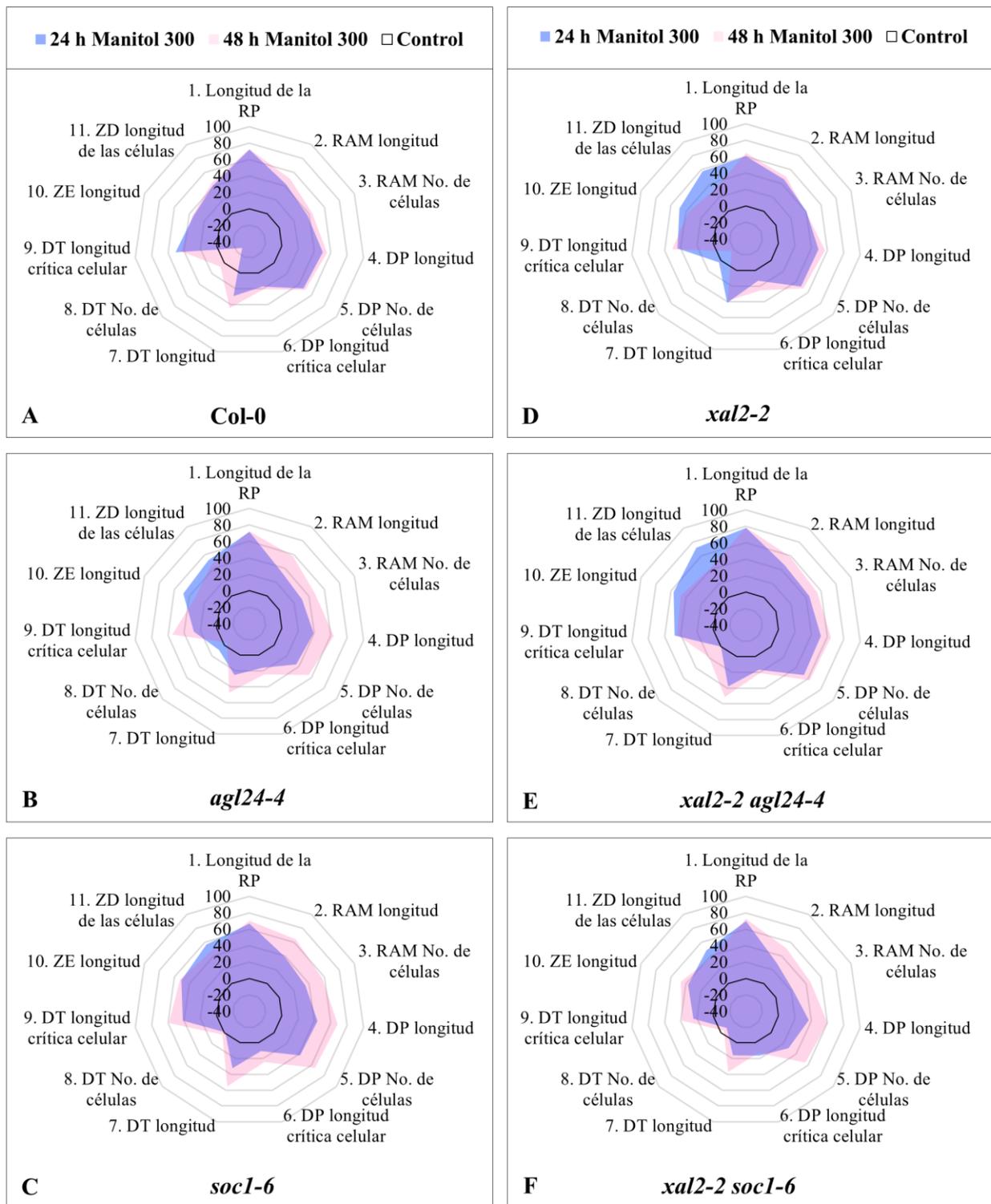


Figura 10. Inhibición causada por el estrés osmótico en las diferentes zonas de crecimiento de la raíz primaria, a las 24 h y 48 h, por genotipo. Los valores en la gráfica de radar representan el cambio porcentual, normalizado con respecto al control ($100 - (\text{tratamiento} \times 100) / \text{control}$). Las plantas ($n = 10$) fueron cultivadas en condiciones control (MS 0.2X) hasta 5 dps y posteriormente trasplantadas al tratamiento control (MS 0.2X) o estrés osmótico (Manitol 300 mM).

XAL2 promueve la elongación y la proliferación celular. En concordancia con lo reportado por Garay-Arroyo et al. (2013), los análisis celulares nos permitieron observar que el tamaño pequeño de la raíz primaria de *xal2-2* (Figura 3A) se debe a alteraciones en el meristemo, en la zona de elongación, en el tamaño final de las células completamente elongadas y en la producción celular (Figura 6 y Cuadro 2). A las 24 h del trasplante, el meristemo de *xal2-2* fue 20% ($P < 0.01$) más pequeño en comparación con el de las plantas silvestres (Figura 8 y A1). Lo anterior es debido a que presenta 23% menos células en el dominio de proliferación, un menor tamaño celular alcanzado del dominio de proliferación hacia el dominio de transición (12%) y del dominio de transición hacia la zona de elongación 25%, así como una reducción del 39% en la producción celular, con respecto a las silvestres (Figura 9B y C, Cuadro 2), de manera concordante con lo reportado por Beemster (2019), y Beemster y Baskin (1998). Además, estas alteraciones permanecieron constantes a las 48 h. De lo que se infiere que, con la pérdida de función de *xal2-2* no ocurre el incremento en el número de células en el dominio de proliferación, que se observa de las 24 a las 48 h en las plantas silvestres (Figura 6 y 9A); lo cual sugiere que *XAL2* es necesario para que se de este incremento. Por el contrario, el tamaño de la zona de elongación de las plantas silvestres permanece constante a las 24 y 48 h de trasplante en condiciones control mientras que, en la mutante *xal2-2* disminuye en 10% y 24%, respectivamente, versus las plantas silvestres (Figura 7 y 8). Lo anterior indica que *XAL2* está involucrado en el mantenimiento de la zona de elongación, confirmando los resultados previamente reportados (Garay-Arroyo et al., 2013).

En condiciones de estrés osmótico XAL2 también está involucrado en el mantenimiento del meristemo. En condiciones de estrés osmótico, *xal2-2* tiene un menor número de células en el dominio de proliferación a las 24 h de exposición al estrés osmótico, con respecto a las plantas silvestres, de manera proporcional a lo observado en condiciones control (Figura 9A). De manera interesante, a las 48 h de exposición al estrés osmótico, *xal2-2* tiene un número de células en el dominio de proliferación con respecto a lo observado a las 24 h (Figura 6). Además, a diferencia de las plantas tipo silvestre, *xal2-2* no exhibió un aumento transitorio del número de células en el dominio de transición ante los cambios abruptos de potencial osmótico (Figura 8 y 10). Por otro lado, *XAL2* no participa en el tamaño crítico de las células en el dominio de proliferación al dominio de transición en respuesta estrés, ya que no hay un cambio con respecto a las plantas silvestres (Figura 10).

Adicionalmente, en condiciones de estrés osmótico, en las plantas *xal2-2* hay un efecto mayor en la zona de elongación y en el tamaño de las células completamente elongadas (Figura 7 y Cuadro 2). Este impacto fue transitorio pues, posteriormente, a las 48 h de estrés osmótico, el tamaño de la zona de elongación de *xal2-2* presentó las mismas diferencias porcentuales con respecto a las plantas silvestres, que en condiciones óptimas (Figura 10). Lo cual indica que la participación de *XAL2* en el mantenimiento de la zona de elongación, además de ocurrir en condiciones óptimas también ocurre en condiciones de estrés osmótico. De manera inesperada, a las 48 h de estrés, el tamaño de las células completamente elongadas y la producción celular de *xal2-2* fue igual al de las plantas silvestres, a diferencia de lo observado en condiciones control (Cuadro 2). En conjunto, los datos anteriores indican que, ante cambios abruptos en potencial osmótico la pérdida de función de *XAL2* afecta la elongación, repercutiendo en el tamaño final de las células maduras de manera transitoria, lo cual podría explicar por qué la raíz primaria de *xal2-2* presenta una inhibición porcentual menor que las plantas silvestres, en comparación con sus respectivos controles (Figura 4).

***SOCI* tiene un efecto negativo sobre la elongación celular en condiciones control.** El análisis cuantitativo de las células corticales mostró que las mutantes *soc1-6* presentan una zona de elongación 11% ($P > 0.05$) y 33% ($P < 0.001$) más larga que las plantas silvestres, a las 24 y 48 h, respectivamente (Figura 6). Lo cual explica el aumento leve, pero estadísticamente significativo, en la longitud de la raíz primaria de *soc1-6*, observado el día 6 post trasplante (Figura 4). Lo anterior sugiere que *SOCI* está involucrado en la regulación del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*, afectando negativamente el proceso de elongación.

Además, se requiere de *SOCI* para el mantenimiento de la proliferación celular en condiciones de estrés osmótico a mediano plazo (a las 48 h de exposición). *soc1-6* no muestra diferencias en el tamaño ni en el número de células en el meristemo a las 24 h de aplicado el estrés. Por otra parte, a las 48 h de estrés, *soc1-6* presentó un meristemo más pequeño que las plantas silvestres, a causa de una disminución (26%; $P < 0.001$) en el número de células en proliferación (Figura 9A y Figura 10A y C). Lo anterior indica que *SOCI* es necesario para que se mantenga la proliferación durante el estrés osmótico.

***SOCI* actúa transitoriamente en el mantenimiento de la elongación durante el estrés osmótico.** Contrario al aumento en la zona de elongación observado en condiciones control, a las 24 h de exposición al estrés osmótico, la zona de elongación de las mutantes *soc1-6* fue 17% más pequeña que en la plantas silvestres ($P < 0.05$; Figura 8 y A1). Así mismo, las células corticales completamente

elongadas de *soc1-6* fueron 18% más pequeñas ($P < 0.05$; Cuadro 2). Sin embargo, dichas disminuciones en la elongación fueron transitorias, pues a las 48 h de tratamiento con manitol no se registraron diferencias significativas, en la zona de elongación ni en el tamaño de las células corticales de *soc1-6*, versus las plantas silvestres (Figura 8 y Cuadro 2). En conjunto, estos resultados explican por qué en condiciones de estrés osmótico *soc1-6* no exhibe el aumento en longitud de la raíz primaria en contraste a lo observado en condiciones óptimas al final del experimento (Figura 4). Lo anterior sugiere que *SOC1* es requerido sólo inicial y transitoriamente para el mantenimiento de la elongación y la proliferación celular ante la exposición a un estrés osmótico severo. Sin embargo, de manera controversial, dichas funciones no se mantienen a mediano plazo, y sería interesante observar que pasa posteriormente a largo plazo.

En la doble mutante *xal2-2 soc1-6* observamos que *SOC1* está por abajo de *XAL2* en la modulación de la proliferación celular. La mutante doble *xal2-2 soc1-6* es estadísticamente igual a *soc1-6* y significativamente diferente a *xal2-2* en el número de células del dominio de proliferación (Figura 9) y en la producción celular (Cuadro 2). Esto sugiere que *soc1-6* es epistático a *xal2-2* sobre la proliferación celular en el meristemo de la raíz. A pesar de que *soc1-6* es epistático a *xal2-2* sobre la proliferación celular, la mutante doble *xal2-2 soc1-6* exhibe una raíz primaria más chica que las plantas silvestres (Figura 3 y 4); lo cual sugiere que en la raíz primaria de *xal2-2 soc1-6* tiene que estar afectada la elongación celular, ya que es el proceso que más aporta al tamaño de la raíz primaria (Figura 8).

En la doble mutante *xal2-2 soc1-6*, *SOC1* actúa como represor de la elongación celular, de forma opuesta a *XAL2*. En condiciones control, la zona de elongación y las células completamente elongadas de la mutante doble *xal2-2 soc1-6* tienen un tamaño intermedio al de ambos parentales y significativamente distinto a ellos; de forma interesante, no hay diferencias significativas con respecto a los valores que presentan las plantas silvestres (Figura 8 y Cuadro 2). Lo cual indica que *XAL2* y *SOC1* tienen un efecto opuesto y posiblemente independiente sobre la elongación celular y esto explica por qué se revierte casi totalmente la longitud de la raíz primaria de la doble mutante.

En estrés, la interacción genética entre *SOC1* y *XAL2* se modifica. La zona de elongación y las células completamente elongadas de las mutantes dobles *xal2-2 soc1-6* son del mismo tamaño que en *soc1-6* y más grandes que en *xal2-2* (Figura 8 y Cuadro 2). Lo mismo ocurre con el número de células, la producción celular y el tamaño del meristemo (Figura 9). Lo que significa que en estas condiciones *soc1-6* es epistático a *xal2-2* en la modulación de la producción y la elongación celular.

La pérdida de función de *AGL24* no causa un efecto en el crecimiento de la raíz primaria en condiciones control con respecto a lo observado en las plantas silvestres. Sin embargo, la pérdida de función de este gen causó una inhibición transitoria en el proceso de elongación en respuesta al estrés osmótico. A las 24 h de exposición al estrés, la longitud de la zona de elongación de *agl24-4* fue 23% ($P < 0.001$) menor, con respecto a las plantas silvestres (Figura 7). Sin embargo, a las 48 h de estrés osmótico, *agl24-4* presentó un tamaño de meristemo, de zona de elongación y de células completamente elongadas, y una producción celular igual al de las plantas silvestres, de manera consistente con los resultados de la longitud de la raíz primaria (Figura 3, 4A y C). A consecuencia de ello, la longitud de la raíz primaria de *agl24-4* fue similar a la silvestre (Figura 4). Lo anterior implica que la pérdida de función de *AGL24* causó una inhibición transitoria en el proceso de elongación, de forma similar a lo observado en las plantas de pérdida de función de *SOC1* y *XAL2* (Figura 8 y 10). Lo cual sugiere que los tres genes pudieran regular mecanismos de aclimatación a corto plazo (24 h de estrés).

La doble mutante *xal2-2 agl24-4* mostró que la interacción genética entre *AGL24* y *XAL2* es distinta en cada parte de la zona de crecimiento de la raíz primaria, en condiciones control. El fenotipo de *xal2-2 agl24-4* presenta una raíz primaria de tamaño intermedio al de sus parentales *xal2-2* y *agl24-4*, en condiciones control. Esto se debe a que, por un lado, *xal2-2 agl24-4* tiene un tamaño de meristemo similar al de *xal2-2*, con un número de células similar en el dominio de proliferación (Figura 7 y 9). Esto indica, que *xal2-2* es epistático a *agl24-4* sobre el control del tamaño del meristemo.

***XAL2* y *AGL24* regulan de manera opuesta la elongación celular en condiciones control.** Por otro lado, en la doble mutante *xal2-2 agl24-4*, el tamaño de las células de la transición del dominio de transición a la zona de elongación, de las células completamente elongadas y de la zona de elongación tienen intermedio al de ambos parentales, y además es estadísticamente igual al de las plantas silvestres (Figura 8 y 9, Cuadro 2). Estos datos muestran que la mutación de *agl24-4* revierte el efecto de la mutación de *xal2-2* en la elongación. Lo cual es consistente con la compensación en el crecimiento de la raíz primaria (Figura 3). Además, *xal2-2 agl24-4* tiene una producción celular similar a la de *agl24-4* y diferente a la de *xal2-2* (Cuadro 2), a pesar de tener un tamaño del meristemo similar a *xal2-2*, lo cual sugiere que la duración del ciclo celular debería estar alterada en *agl24-4*.

Estos resultados sugieren que la interacción genética entre *AGL24* y *XAL2* es distinta en cada parte de la zona de crecimiento de la raíz primaria. Por un lado, la inhibición de la elongación,

observada en la mutante de *XAL2*, se revierte en la cruce con *AGL24*, pero eso no sucede en el tamaño del meristemo. Por otro lado, la interacción de ambos genes afecta la elongación celular de manera diferente a como la hace la mutante sencilla de *xal2-2*. Estos datos en conjunto explican el fenotipo intermedio entre ambos parentales de raíz primaria de *xal2-2 agl24-4* (Figura 4), debido a que la elongación es el proceso que más aporta al tamaño de la raíz primaria.

La raíz primaria de la mutante doble *xal2-2 agl24-4* se afecta proporcionalmente más en estrés osmótico que la de sus parentales. La mutante doble de *xal2-2 agl24-4* tiene un dominio de proliferación con tamaño y un número de células igual al *xal2-2* y menor que el *agl24-4* y las plantas silvestres a las 24 y a las 48 h de estrés osmótico (Figura 9). Así mismo, *xal2-2 agl24-4* tiene un tamaño de células completamente elongadas drásticamente menor que *agl24-4* y las plantas silvestres e igual al de *xal2-2*, a las 24 de exposición al estrés (Cuadro 2). Lo anterior ocasiona que *xal2-2 agl24-4* presente un fenotipo similar al de *xal2-2* (Figura 3). Esto explica el tamaño de la raíz primaria de la doble mutante (Figura 4). De manera contrastante, a las 48 h, el tamaño final de las células completamente elongadas de *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2* fue igual al de las plantas silvestres y al de *agl24-4* (Cuadro 2). Por otro lado, la zona de elongación de la mutante doble presenta un tamaño igual al de ambos parentales, y menor que las plantas silvestres, a las 24 h de estrés; pero igual a *xal2-2* y a las plantas silvestres, y menor que *agl24-4*, a las 48 h (Figura 8 y 10). Lo que sugiere que, en estas condiciones de estrés *xal2-2* es epistático a *agl24-4* en el tamaño de la zona de elongación a las 48 h de aplicado el estrés. Lo anterior apunta a que la participación de *XAL2* es necesaria para que *AGL24* regule la elongación. Por lo tanto, se puede decir que *XAL2* está por abajo de *AGL24* en la vía de la regulación del tamaño de la zona de elongación a las 48 h estrés osmótico.

4.3. Modulación del crecimiento de la raíz mediado por ácido abscísico (ABA).

Las hormonas son componentes clave en los módulos de regulación del desarrollo de la raíz primaria, dirigen tanto la división como la elongación celular (Garay-Arroyo et al., 2012; Heja y Benkova, 2009). En ese sentido, evaluar la participación de *XAL2*, *AGL24*, *SOCI* sobre la función hormonal podría proporcionar una base molecular para explicar su participación en la regulación del tamaño del meristemo de la raíz.

ABA es reconocida como una hormona maestra en la regulación del crecimiento en respuesta a estrés osmótico, y además se requiere que ABA esté presente en una cierta concentración para el crecimiento adecuado en condiciones óptimas. La inhibición del crecimiento de la raíz por efecto del estrés osmótico está bajo el control de diferentes vías de señalización hormonal. Específicamente, se ha establecido que la modulación del crecimiento de la raíz frente al estrés osmótico es en gran medida dependiente de ABA (Fujita et al., 2011). El aumento en los niveles endógenos de ABA es una de las respuestas primarias ante el estrés osmótico (Sivakumaran y Hall, 1978). Así mismo, al aplicar concentración de ABA mayores a 1 μM , el crecimiento de la raíz primaria y de las raíces laterales disminuye (Xing et al., 2016), mimetizando lo que ocurre en condiciones de estrés (Bartels y Sunkar, 2005). El ABA regula el crecimiento de la planta afectando tanto los procesos de proliferación, mediante la supresión de la división celular en la parte proximal del meristemo como de diferenciación, controlando la tasa de elongación a nivel celular (Rowe et al., 2016 Zhang et al., 2010).

En este trabajo previamente identificamos que el efecto de los genes *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* es requerida para la regulación del crecimiento de la raíz primaria en estrés osmótico. Por lo tanto, nos hicimos la siguiente pregunta: ¿en qué vía de señalización de respuesta al estrés osmótico están involucrados *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* para llevar a cabos su función? Las repuestas a estrés hídrico y osmótico son reguladas a través de las vías de transducción de señales dependientes o independientes de ABA (Chen y Fluhr, 2018; Yoshida et al., 2014). Por lo cual, en este trabajo consideramos abordar la siguiente hipótesis: *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* regulan el crecimiento de la raíz primaria en condiciones óptimas y de estrés osmótico de manera dependiente de ABA. Para explorar esta posibilidad utilizamos una aproximación química, examinando si la longitud de la raíz de las mutantes sencillas y dobles responde de manera diferencial en un medio adicionado con concentraciones inhibitorias del crecimiento de esta fitohormona. Previamente, fue necesario determinar la concentración adecuada en la que el ABA inhibe el crecimiento de la raíz primaria en las plantas silvestres, en nuestras propias

condiciones experimentales. Para ello, plántulas de 5 dps fueron transferidas a concentraciones distintas de ABA, en un gradiente de 2.5 a 25 μM , para su crecimiento durante seis días (Figura 11). La longitud de la raíz primaria resultó gradualmente afectada dependiendo de la concentración de ABA, de forma similar a reportes previos (Jiao et al., 2013; Ling et al., 2007). Decidimos seguir trabajando con una concentración de ABA 10 μM que inhibió el crecimiento de manera intermedia (Figura 11).

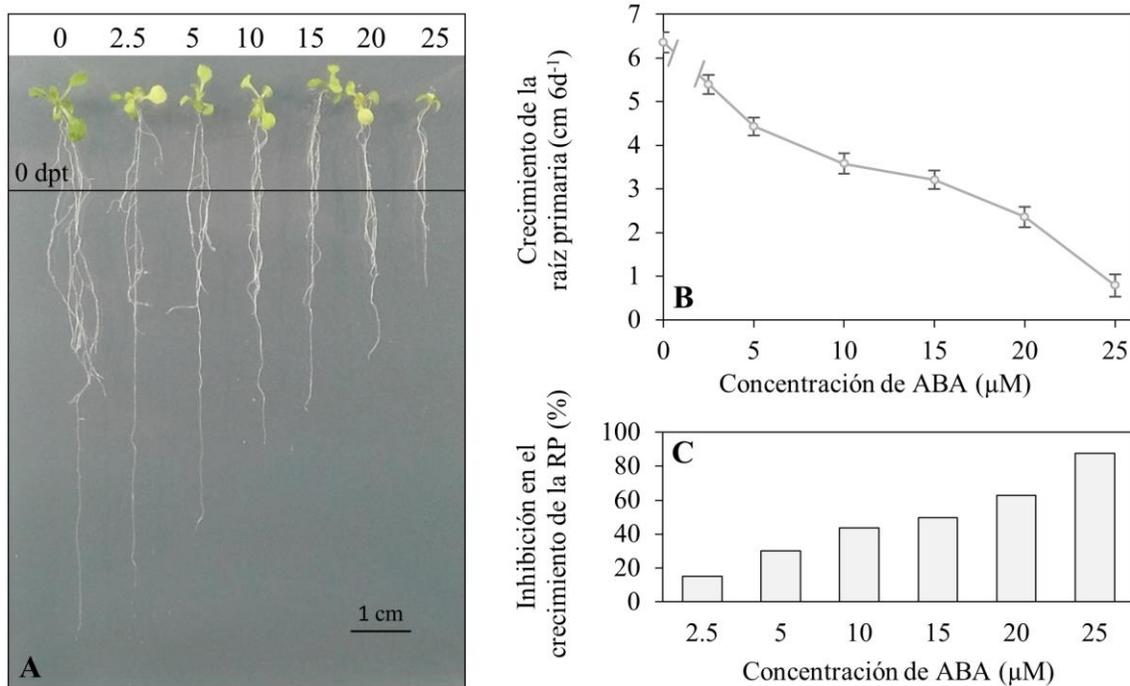


Figura 11. Efecto de un gradiente de concentraciones de ABA exógeno en la disminución del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*. **A)** Plántulas tipo silvestre a los 6 dpt (días post trasplante). **B)** Longitud de la raíz primaria de plántulas tipo silvestre a los 6 dpt en diferentes concentraciones de ABA. Las plántulas fueron transferidas a los 5 dps al medio control (MS 0.2X) o al medio con diferentes concentraciones de ABA. Los datos son la media \pm EE, $n = 30$. **C)** Inhibición del crecimiento de la raíz primaria por efecto de diferentes concentraciones de la ABA. Calculada partir de la media de la longitud de la raíz primaria ($100 - (\text{tratamiento de ABA} \times 100) / \text{control}$).

Posteriormente, se evaluó si el crecimiento de la raíz de nuestras mutantes sencillas y dobles responde de manera diferencial en un medio adicionado con ABA 10 μM . El experimento se realizó con un diseño factorial con tres repeticiones, donde las fuentes de variación fueron el Factor A) Genotipo con seis niveles (Col-0 WT, *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6*), y el Factor B) Tratamiento con dos niveles (Control (MS 0.2X) y ABA 10 μM). Las plántulas fueron cultivadas en un medio MS 0.2X y posteriormente trasplantadas al mismo medio adicionado con

ABA 10 μ M o sin ABA (control), para su crecimiento durante seis días. La longitud de la raíz primaria fue marcada en la caja de crecimiento diariamente durante el tratamiento para su posterior medición (Figura 13). El ANOVA de dos vías mostró que la longitud de la raíz primaria a los seis días del tratamiento fue afectada por el genotipo ($P<0.0000$), el tratamiento de ABA ($P<0.0000$) y la interacción estadística de ambos factores ($P<0.0000$).

Crecimiento de la raíz primaria de las diferentes mutantes en ABA 10 μ M. Las dos líneas donde se ve más claro el efecto inhibitorio de la adición de ABA 10 μ M son *xal2-2* y *xal2-2 agl24-4*.

***xal2-2* exhibe una relativa insensibilidad a la inhibición del crecimiento causada por ABA 10 μ M.** En plantas silvestres el tratamiento con ABA 10 μ M tuvo un efecto inhibitorio del 49%, en tanto que, en las mutantes *xal2-2* la inhibición fue de 34%, con respecto al control (Figura 12). Estos resultados sugieren que *XAL2* puede promover el crecimiento de la raíz parcialmente de forma dependiente de ABA, y que participa en la respuesta a esta fitohormona, así como en la respuesta a estrés osmótico. Lo anterior concuerda con la relativa insensibilidad observada en *xal2-2* en altas concentraciones de manitol (Figura 4). Probablemente la modulación del crecimiento de la raíz por *XAL2* ante condiciones que generen altas concentraciones endógenas de ABA, como el estrés osmótico, sea parcialmente dependiente de ABA.

***agl24-4* y *soc1-6* son levemente menos sensibles a ABA 10 μ M que las plantas silvestres.** A su vez, en ABA 10 μ M las mutantes sencillas *agl24-4* y *soc1-6* exhibieron una inhibición del crecimiento levemente menor que las plantas silvestres. Pues tanto *agl24-4* como *soc1-6* presentaron una raíz 44% más pequeña a causa del tratamiento con ABA, en contraste con el 49% de inhibición presentado por las plantas silvestres (Figura 12). Por lo tanto, las diferencias en la longitud raíz primaria de *agl24-4* y *soc1-6* con respecto a las plantas silvestres se incrementaron de 4% y 7% respectivamente en el tratamiento sin ABA, a cerca del 18% más largas en ABA 10 μ M, lo cual representó diferencias significativas. Esto contrasta con lo observado en estrés osmótico, donde *agl24-4* y *soc1-6* responden igual que las plantas silvestres (Figura 12). Lo anterior sugiere que *AGL24* y *SOC1* podrían estar participando de manera positiva en la respuesta de inhibición del crecimiento dependiente de ABA.

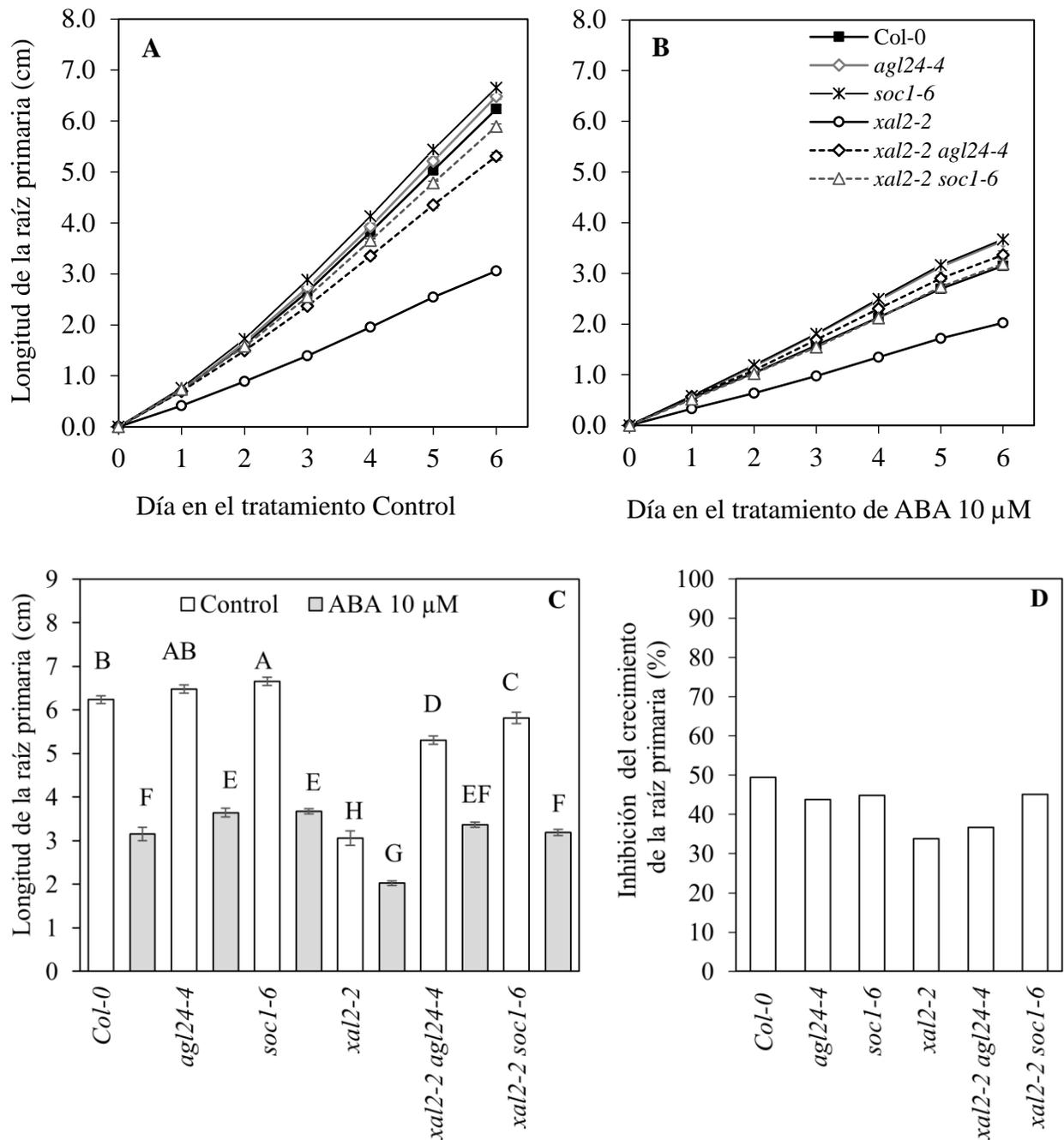


Figura 12. Las mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* como los parentales *agl24-4* y *xal2-2* son **significativamente menos sensibles al efecto inhibitorio de ABA 10 μM en el crecimiento de la raíz primaria.** Longitud de la raíz primaria (cm) de plántulas de Arabidopsis. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps a **A)** medio control (MS 0.2X) o **B)** suplementado con ABA 10 μM, para su crecimiento durante un período de 6 días **C)** Longitud de la raíz primaria a los 6 días de tratamiento con ABA. Los datos son la media ± EE, de al menos $n = 20$ por réplica experimental de 3 réplicas experimentales independientes. Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de comparación múltiple de medias Tukey (0.05). **D)** Inhibición del crecimiento por efecto del ABA 10 μM a los 6 días de tratamiento. Calculada partir de la media de la longitud de la raíz primaria ($100 - (\text{tratamiento de ABA} \times 100) / \text{control}$).

El efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz de ABA 10 μ M en la mutante doble *xal2-2 agl24-4* es proporcional al de *xal2-2*. De manera interesante, el tratamiento de ABA 10 μ M causó una inhibición del 37% en el crecimiento de la raíz de la mutante doble *xal2-2 agl24-4*, exactamente igual que la respuesta de *xal2-2* (Figura 12). Sin embargo, la longitud de la raíz no es diferente a lo observado en las plantas silvestres y en la mutante sencilla *agl24-4*. En contraste, en condiciones de estrés osmótico, la doble mutante es más sensible al tratamiento que la planta silvestre. Estos resultados muestran una interacción genética distinta entre *XAL2* y *AGL24* en la respuesta inhibitoria de la raíz causada por estrés osmótico ABA 10 μ M y por manitol 300 mM, lo cual sugiere que el efecto en estrés osmótico es independiente o parcialmente independiente de ABA (Figura 4).

El efecto de *SOC1* sobre el crecimiento de la raíz primaria es opuesto al de *XAL2*, independientemente de las altas concentraciones de ABA en el medio. Tanto la mutante sencilla de *SOC1* (*soc1-6*) como la mutante doble *xal2-2 soc1-6*, no presentan cambios en la longitud de raíz primaria con respecto a las plantas silvestres. Para el caso de la doble mutante esto implica que la mutación de *soc1-6* compensa totalmente el efecto inhibitorio de la raíz causado por la mutación de *xal2-2* sobre la raíz primaria, en esta concentración de ABA. Lo anterior sugiere que *SOC1* es epistático sobre *XAL2*, lo que quiere decir que actúan en la misma vía, y que *SOC1* está abajo de *XAL2*. Esta respuesta se asemeja a lo observado en condiciones de estrés osmótico severo, donde la mutante doble presenta una raíz de tamaño igual al de las plantas silvestres y presenta una inhibición del crecimiento igual que la de *soc1-6* (Figura 12).

A pesar de que el ABA ha sido ampliamente estudiado como inhibidor del crecimiento, también se ha demostrado que es necesario para el crecimiento normal de la raíz en condiciones no estresantes (Zhang et al., 2010). Incluso cuando ABA se aplica a concentraciones cercanas a 1 μ M, promueve el crecimiento de la raíz de forma similar a lo observado en plantas expuestas a un déficit hídrico moderado (Ephritikhine et al., 1999; Li et al., 2017; Xu et al., 2013). Para profundizar en la respuesta de nuestras mutantes ante ABA, decidimos reducir el contenido endógeno de ABA mediante un tratamiento químico con fluridona que es un inhibidor de la síntesis de ABA (Fong et al., 1983; Rowe et al., 2016). Además, en otro experimento, utilizamos una concentración de ABA que promueve el crecimiento. En ambos experimentos las plántulas de 5 días de edad post germinación, fueron transferidas a medio con o sin ABA 0.1 μ M, o con o sin fluridona 0.1 μ M. A partir del trasplante la longitud de la raíz primaria se midió diariamente y se analizó estadísticamente al día 6 después de los tratamientos (Figura 13 y 14).

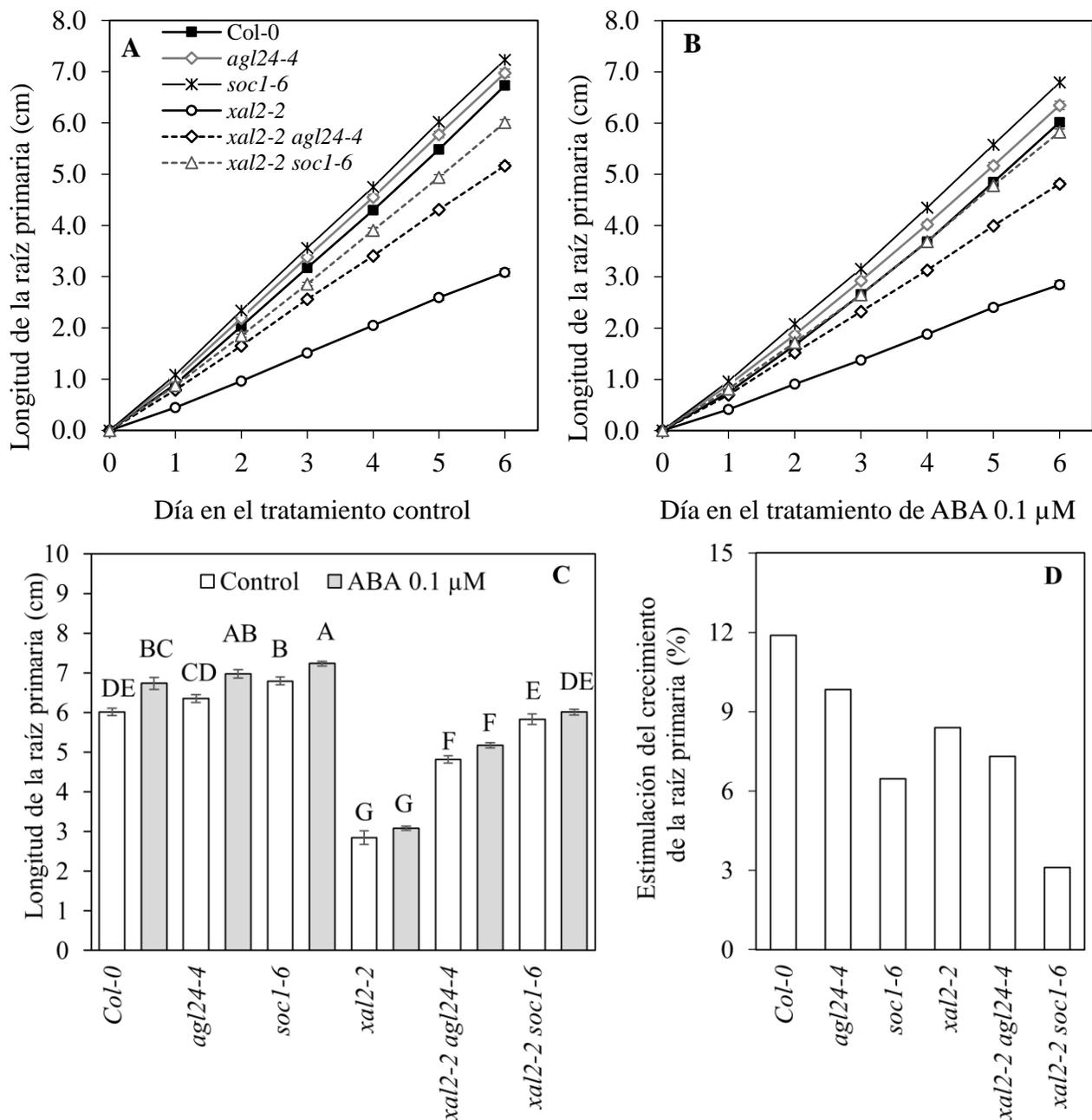


Figura 13. A diferencia de las plántulas tipo silvestre *Col-0*, *xal2-2* y las mutantes dobles *xal2-2 agl24-4*, *xal2-2 soc1-6* no presentaron una estimulación significativa por el efecto de ABA 0.1 μM. Longitud de la raíz primaria (cm) de plántulas de *Arabidopsis*. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps a medio **A)** control (MS 0.2X) o **B)** suplementado con ABA 0.1 μM, para su crecimiento durante un período de 6 días. **C)** Longitud de la raíz primaria a 6 días de tratamiento con ABA 0.1 μM. Los datos son la media ± EE, de al menos $n = 20$ por réplica experimental. Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de comparación múltiple de medias Tukey (0.05). **D)** Estimulación del crecimiento por efecto del ABA 0.1 μM a los 6 días de tratamiento. Calculada partir de la media de la longitud de la raíz primaria ((tratamiento de ABA*100 / control)-100).

Los ANOVAs de dos vías de la longitud de la raíz primaria al día seis indicaron que existe una variación altamente significativa entre los genotipos ($P < 0.0000$) y entre los tratamientos ($P < 0.0000$); además, indicaron que hay interacción estadística de los genotipos con los tratamientos ($P < 0.0000$).

Crecimiento de la raíz primaria de las diferentes mutantes en ABA 1 μM . Todas las líneas mutantes que se probaron en este trabajo se comportan de manera diferente a la planta silvestre, aunque la que se parece más es *agl24-4*.

Las mutantes *xal2-2*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* tienen menos sensibilidad al efecto estimulador de ABA 0.1 μM en el crecimiento de la raíz. ABA 0.1 μM estimula el crecimiento de la raíz primaria del Col-0 en un 12%; en cambio, este efecto no se observó en ninguna de las líneas mutantes con las que se trabajó, indicando que los tres genes son importantes para que se de este crecimiento en la planta silvestre (Figura 13). *agl24-4* tiene una respuesta a esta concentración de ABA muy parecida a la de la planta silvestre. En cambio, la raíz primaria de la doble mutante *xal2-2 soc1-6* casi no presenta la estimulación en el crecimiento, por efecto de esta concentración de ABA. Asimismo, las tres líneas *xal2-2*, *soc1-6* y *xal2-2 agl24-4* tienen una respuesta intermedia (Figura 13). Todo lo anterior indica que *AGL24* es el gen que menos participa en esta respuesta mediada por ABA y se requiere de la interacción entre los genes *SOC1* y *XAL2* para tener el efecto estimulador que se ve en la planta silvestre (Figura 13).

Crecimiento de la raíz primaria de las diferentes mutantes en fluridona 0.1 μM . Las dos líneas que se comportan diferente a la planta silvestre en estas condiciones de crecimiento son *agl24-4* que es ligeramente más sensible a la inhibición de fluridona y la doble mutante *xal2-2 agl24-4* que es menos sensible.

La regulación de *XAL2* y *SOC1* del crecimiento de la raíz en condiciones óptimas de crecimiento es independiente de ABA. En este trabajo, disminuir la síntesis de ABA mediante el tratamiento con fluridona 0.1 μM tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz primaria, afectando en 35% el tamaño de la final en las plantas silvestres, con respecto al control (Figura 14). Así mismo, la respuesta de *xal2-2*, *soc1-6* y *xal2-2 soc1-6* al tratamiento con fluridona no es diferente al que presentan las plantas silvestres, lo que sugiere que el efecto de *XAL2* y *SOC1* no es requerida para el crecimiento mediado por ABA en condiciones óptimas.

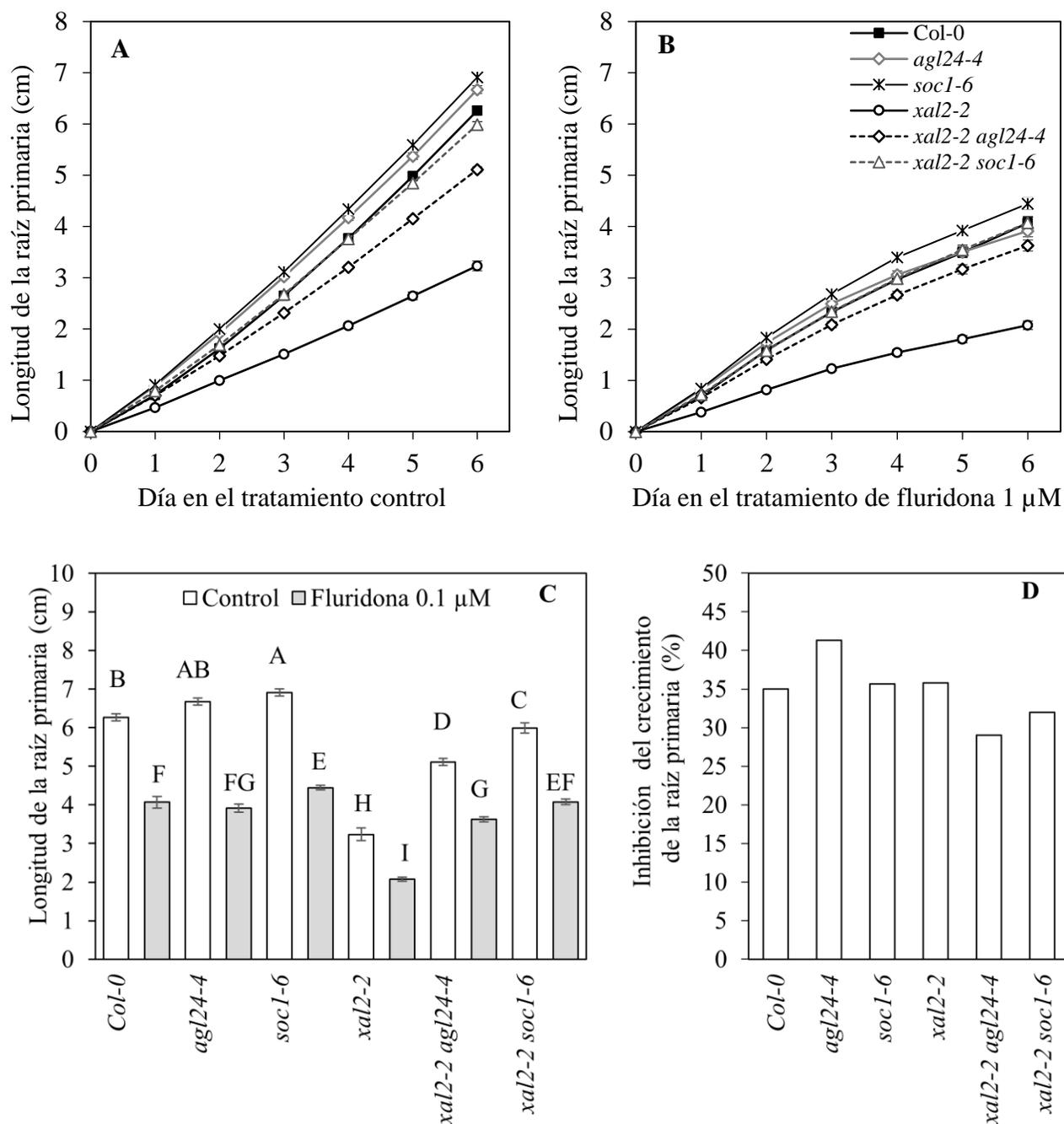


Figura 14. Las mutantes de *agl24-4* fueron más sensibles a la inhibición por fluridona. Longitud de la raíz primaria (cm) de plántulas de *Arabidopsis*. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps a medio **A)** control (MS 0.2X) o **B)** suplementado con fluridona 0.1 μM, para su crecimiento durante un período de 6 días. **C)** Longitud de la raíz primaria a 6 días de tratamiento con fluridona 0.1 μM. Los datos son la media ± EE, de al menos $n = 20$ por réplica experimental. Letras distintas indican diferencias significativas en la prueba de comparación múltiple de medias Tukey (0.05). **D)** Inhibición del crecimiento por efecto del fluridona 0.1 μM a los 6 días de tratamiento. Calculada a partir de la media de la longitud de la raíz primaria $(100 - (\text{tratamiento de ABA} * 100) / \text{control})$.

Así mismo, la hipótesis de que en condiciones óptimas el fenotipo de raíz corta de *xal2-2* se pudiera deber a altas concentraciones de ABA endógenas que generara una respuesta inhibitoria en el crecimiento, queda descartada. Pues en ese caso, al inhibir la biosíntesis de ABA mediante fluridona la raíz de *xal2-2* tendría que crecer más que en condiciones control; sin embargo, la raíz de *xal2-2* es afectada de forma proporcional a Col-0. Por otro lado, no se descarta que la inhibición de crecimiento pudiera ser resultado de una respuesta al estrés mediada por una vía independiente de ABA, como se aborda en la siguiente sección subsecuente de este trabajo (Sección 6.4).

El crecimiento de la raíz de *agl24-4* es levemente más sensible a la inhibición por fluridona. Por otro lado, la doble mutante *xal2-2 agl24-4* se inhibe menos que la planta silvestre (29% vs. 35%) por efecto de la fluridona, mientras que la mutante sencilla *agl24-4* presentó una inhibición del 41% con respecto a su crecimiento en condiciones control (Figura 14). Lo anterior muestra un ligero aumento en la sensibilidad a la fluridona a causa de la pérdida de función de *AGL24*.

Con todos estos datos podemos decir que estos tres genes (*AGL24*, *SOCI* y *XAL2*) participan en el crecimiento de la raíz primaria mediada por ABA. Aunque no hay análisis funcionales previos que demuestren si *AGL24* está involucrado en la vía de ABA, se sabe que los niveles de mRNA de *AGL24* aumentan levemente en respuesta a ABA (100 mM) en las células guarda y en células cultivadas (Böhmer y Schroeder, 2011; Yang et al., 2008). Lo cual concuerda con el efecto positivo de *AGL24* sobre la inhibición de la raíz causado por ABA 10 μ M observado en el presente trabajo (Figura 12).

Asimismo, está reportado que *SOCI* participa en el catabolismo de ABA, y como un gen de respuesta a ABA; además, actúa por debajo de la vía de la transducción de señales de ABA, durante la germinación y en la respuesta de escape a la sequía (Bezerra et al., 2004; Chiang et al., 2009; Du et al., 2018; Hwang et al., 2019; Riboni et al., 2013, 2016; Wang et al., 2018b). Estos datos concuerdan con la respuesta en el crecimiento de la raíz primaria de *SOCI* causado por el efecto de ABA exógeno.

Inicialmente, para establecer si *AGL24*, *XAL2* o *SOCI* actúan en respuesta a estrés osmótico a través de la vía de ABA, se podría medir la expresión de dos marcadores de ABA: *RAS-RELATED SMALL GTPASE HOMOLOG B18 (RAB18)* y *RESPONSIVE TO DESICCATION 29B (RD29B)*, en las mutantes *xal2-2*, *agl24-4* y *soc1-6*, en condiciones de estrés y de ABA 10 μ M (Finkelstein et al., 2005; Hauser et al., 2018; Rosales et al., 2019). Si en las mutante hubiera una menor expresión de los

marcadores que en Col-0 en estrés osmótico y no en ABA, entonces podríamos especular que, estos tres genes *AGL24*, *XAL2* o *SOC1* responden al estrés osmótico por la vía independiente de ABA.

4.4. Análisis del patrón de expresión de proteínas en 2D SDS-PAGE

Con la intención de identificar proteínas involucradas en el desarrollo de la raíz primaria que sean regulados por la actividad de las proteínas con dominio-MADS *XAL2*, *AGL24* y *SOC1*, realizamos un análisis del patrón proteico en geles 2D de poliacrilamida con SDS-PAGE de las líneas de mutantes sencillas *xal2-2*, *agl24-4* y *soc1-6* y dobles *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6*. Las proteínas que nos interesaban eran aquellas que cambiaran su abundancia en *xal2-2* con respecto a las plantas tipo silvestre (Col-0), y que en las *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* presentaran una abundancia similar a Col-0. Esto con la finalidad de correlacionar el fenotipo observado en las diferentes mutantes con los procesos biológicos que pudieran estar regulando traduccionalmente.

Extrajimos las proteínas totales del primer centímetro apical de la raíz de plántulas de seis dps de edad de todas las líneas genéticas trabajadas en este estudio. Para verificar la integridad y calibrar la concentración de las proteínas extraídas se corrió un gel y se cuantificó la densidad óptica que refleja la concentración de proteínas de todo el carril (Figura 15). Una vez que las muestras fueron calibradas, se realizó la separación y visualización del contenido de proteínas en geles 2D SDS-PAGE en función de su punto isoelectrónico y su peso molecular; esto permite ver los componentes del proteoma como puntos en una superficie con un patrón característico para cada genotipo.

Inicialmente, se realizaron pruebas en tres diferentes rangos de pH (3-10, 4-6 y 5-8) únicamente para las muestras de Col-0 y *xal2-2*. Para el análisis final, se optó por utilizar el isoelectroenfoco (IEF) de pH 3 a 10, por ser el rango en el que se apreciaron mejor los puntos en las imágenes de los geles capturados mediante un escáner de alta resolución (GS-900 Calibrated Imaging Densitometer; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Figura 16). Realizamos tres réplicas para cada uno de los genotipos estudiados: Col-0, *xal2-2*, *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6*, en las cuales el patrón de proteínas fue reproducible. Se observó que la pérdida de función del alelo *xal2-2* altera la regulación de una gran cantidad de proteínas (Figura 16).

Realizamos un análisis global preliminar del patrón 2D del proteoma de las dos réplicas de *xal2-2* y Col-0. En este caso, la detección, el marcaje y la cuantificación de la abundancia de proteína se realizó para cada punto de cada uno de los dos geles. Los valores cuantificados fueron normalizados para corregir la variación entre geles que no está relacionada con cambios en la

expresión de las proteínas, sino con el error experimental. Para cada punto se comparó la abundancia de proteína entre genotipos, y para seleccionar los puntos con diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) se empleó el programa de Spot Detection Wizard y se aplicó un análisis estadístico t de student en PDQuest 8.1.

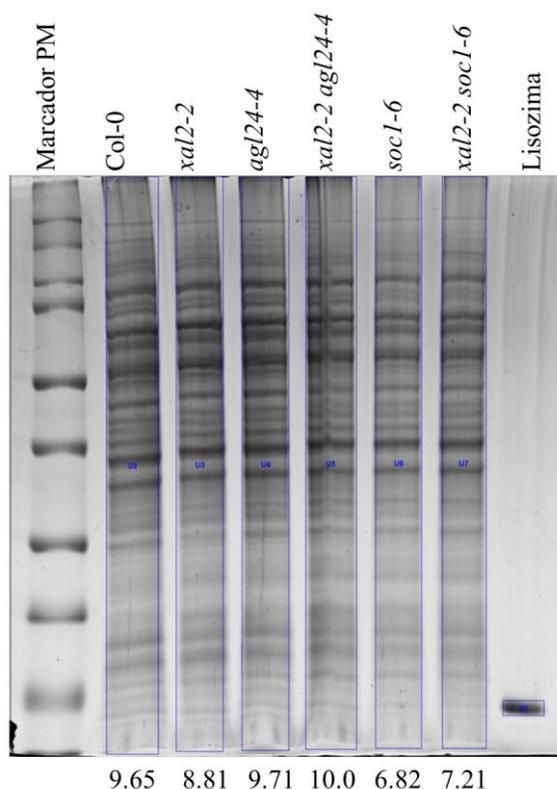


Figura 15. SDS-PAGE 1D de verificación de integridad y cuantificación de la concentración de las proteínas extraídas (4 μ g) de 1 cm del ápice de la raíz primaria de los diferentes genotipos. Se utilizó 1 μ g de lisozima como referencia. Los valores representan la concentración de proteínas cuantificada en la muestra de 1 cm del ápice de raíz primaria de cada genotipo mediante Image Lab 5.2.1.

Los resultados del análisis global mostraron 9901 puntos en los gels de los cuales, 894 fueron regulados afectados por la pérdida de función de *xal2-2*, de los cuales la abundancia de 459 proteínas aumentó y de 435 disminuyó, con respecto a Col-0. Esto evidencia la importancia de *XAL2* en la regulación de la abundancia de una gran cantidad de proteínas, muchas de las cuales seguramente participan en el desarrollo de la raíz primaria y son responsables del fenotipo que observamos en la mutante *xal2-2*.

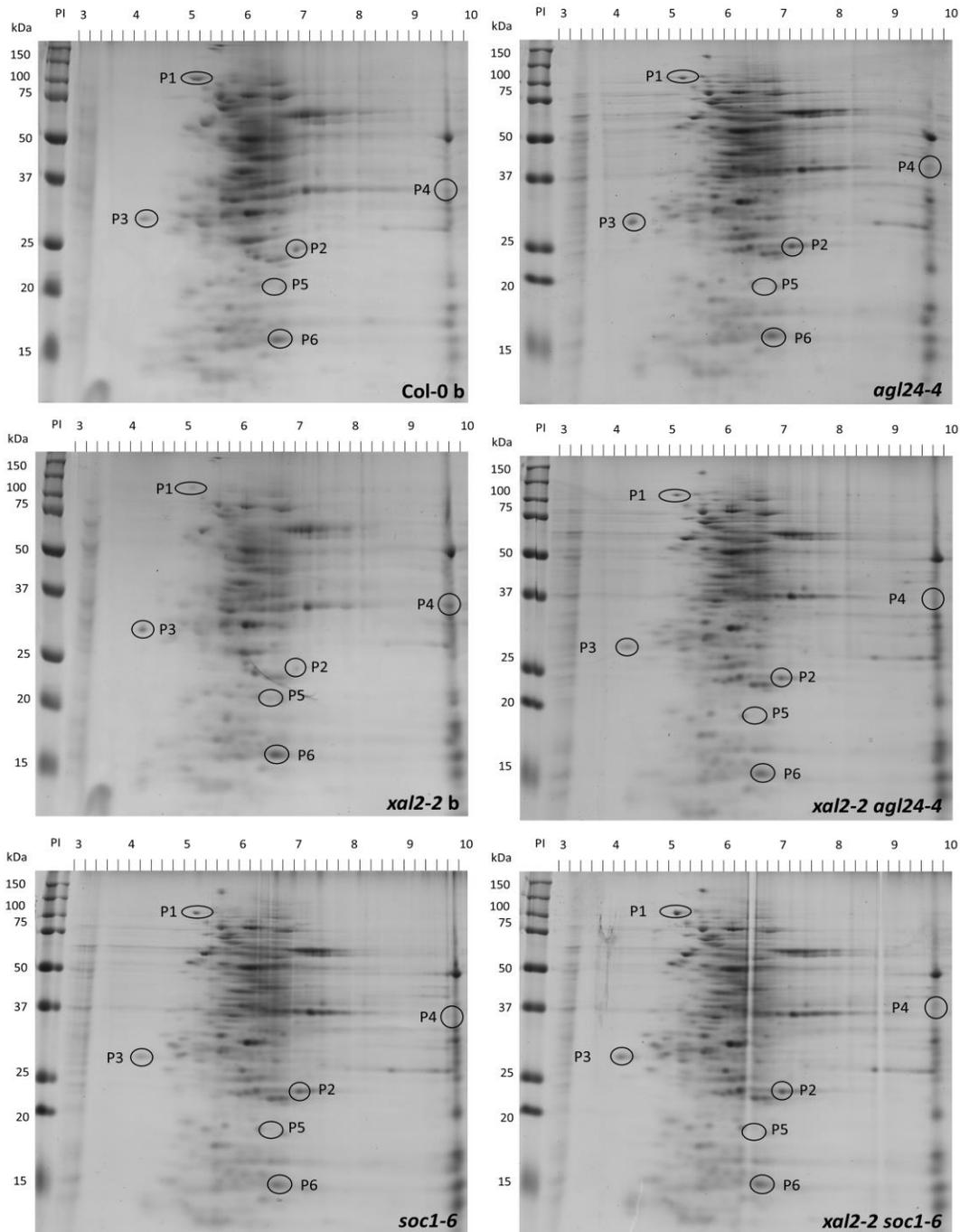


Figura 16. XAL2 es necesario para la expresión normal de una gran cantidad de proteínas en el ápice de la raíz primaria de Arabidopsis. Patrón de expresión de proteínas 2D SDS-PAGE del 1^{er} cm apical de la raíz primaria de plántulas de Arabidopsis, con 6 dps, de los genotipos Col-0, *xal2-2*, *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6*. Las proteínas fueron analizadas en un gradiente de pH 3-10 por IEF seguido de una SDS (12% PAGE). Los puntos marcados fueron escogidos para su comparación con Col-0. Seis puntos fueron seleccionados para comparar su abundancia entre genotipos, se indica la clave y las veces de cambio a partir del procedimiento densométrico del volumen ajustado en Image Lab 5.2.1. Las imágenes representan tres repeticiones.

A continuación, seleccionamos seis puntos que presentaron alteraciones visualmente evidentes en la abundancia de las proteínas entre los geles de *xal2-2* versus Col-0 (Figura 16 y 17A). Posteriormente, las seis proteínas seleccionadas fueron purificadas a partir de la extracción del gel de Col-0 (proteínas 1 y 2) y del gel de *xal2-2* (proteínas 3-6) (Figura 15). La secuenciación de los péptidos de las proteínas se realizó mediante espectrometría de masas, posteriormente se identificaron y compararon con una base de datos especializada de Arabidopsis (UNIPROT), mediante el programa computacional PLGS (Protein Lynx Global Server, versión 2.5.3). A su vez, cuantificamos las diferencias en la abundancia de las proteínas mediante el procedimiento de cuantificación del volumen ajustado del programa Image Lab a partir de las imágenes escaneadas de los geles (Figura 17B). Paralelamente, a este trabajo mediante qRT-PCR en mutantes de *xal2-2* se midió la expresión transcripción de los genes que codifican las proteínas identificadas (Zluhan-Martínez et al., datos sin publicar).

Cuadro 3. Proteínas identificadas

Proteína	Clave UNIPROT	Descripción	mW (Da)	pI (pH)	PLGS Score	Gen que la codifica
1	NAI2_ARATH	TSA1-like protein	84964	4.4194	16613.53	AT3G15950
2	A0A178VP05_ARATH	GSTF9	24130	6.1831	27991.88	AT2G30860
3	Q9SXE9_ARATH	T3P18 4	16618	3.8174	85687.13	AT1G62480
4	A0A178VHF3_ARATH	60S acidic ribosomal protein P0	34111	4.7769	17661.09	AT3G09200
5	A0A178UHL8_ARATH	Uncharacterized protein	21781	5.9458	5090.021	AT5G54500
6	Q9SUR0-ARATH	Uncharacterized protein	17506	5.9004	35563.49	AT4G23670

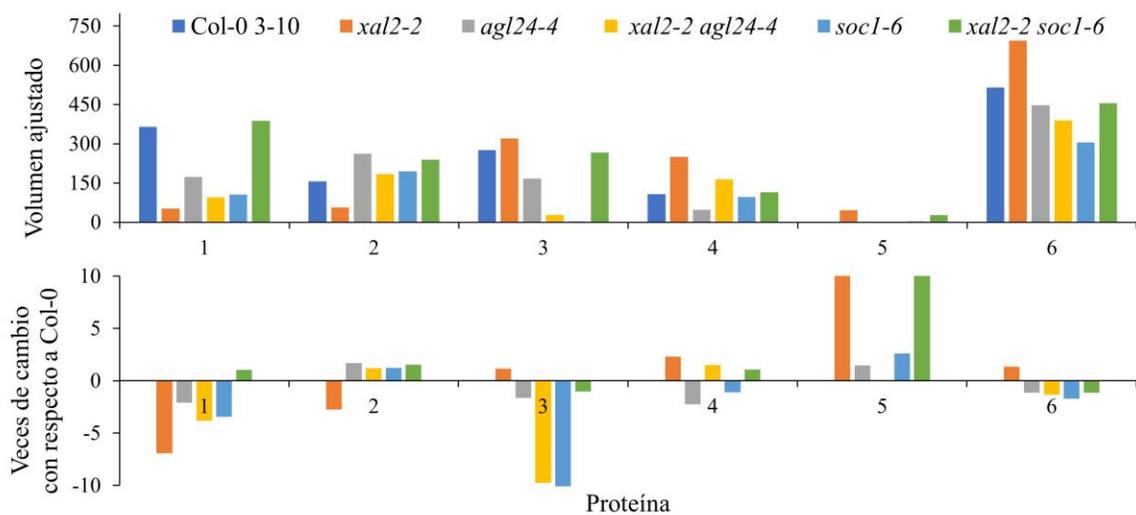
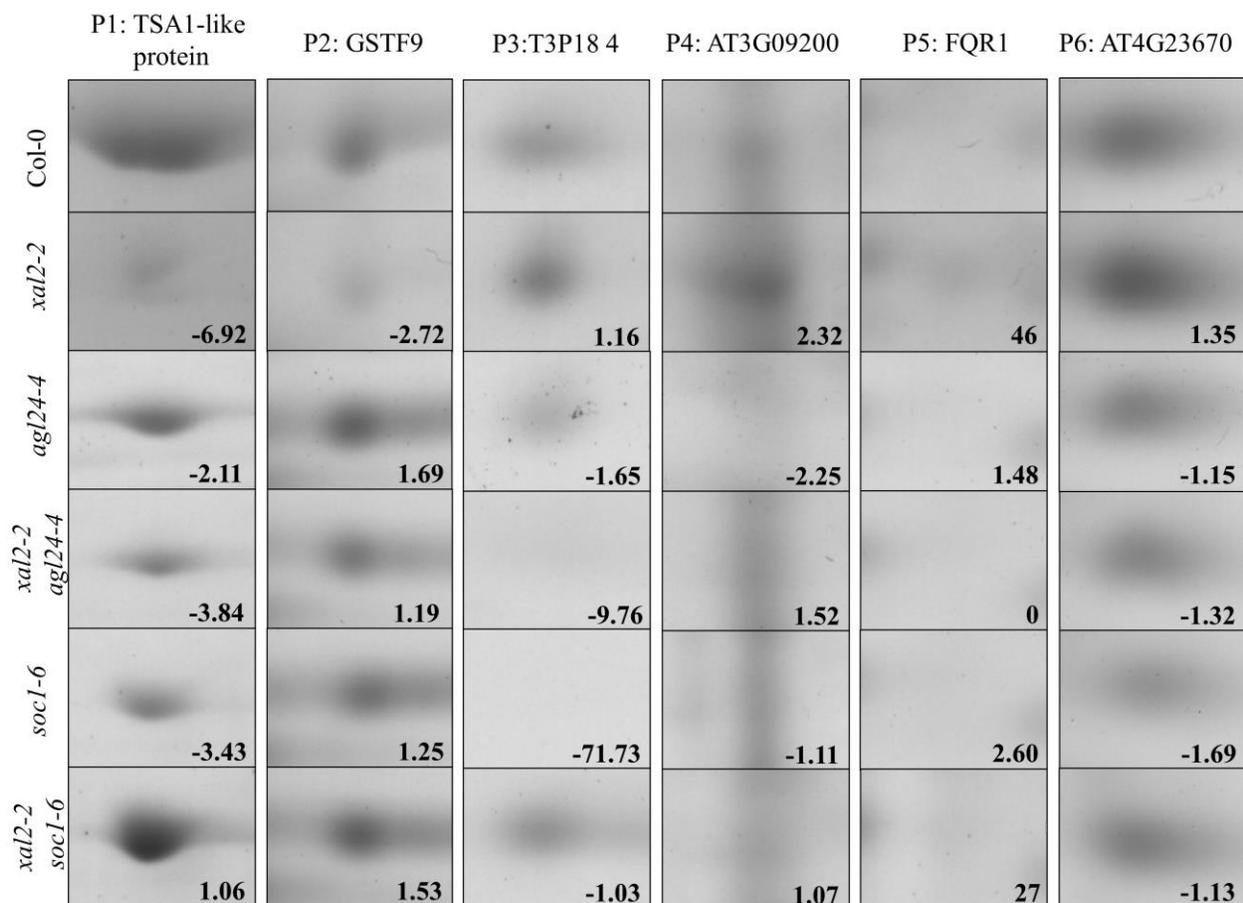


Figura 17. Ampliación de la imagen de las proteínas del gel 2D SDS-PAGE del 1^{er} cm apical de la raíz primaria de plántulas de *Arabidopsis* con 6 dps, de los genotipos Col-0, *xal2-2 agl24-4 soc1-6*, *agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* de la Figura 16. Se muestran las veces de cambio en abundancia en las proteínas en los genotipos mutantes señalados con

respecto a Col-0. B) Volumen ajustado de abundancia de proteína obtenido a partir del análisis en el programa Image Lab. C) Veces de cambio entre los puntos de los genotipos mutantes con respecto a Col-0.

De las seis proteínas seleccionadas, *XAL2* regula positivamente la acumulación de las proteínas 1 y 2, mientras que regula negativamente a la 3, 4, 5 y 6 (Figura 17). La proteína 1 TSA1-like es miembro de una familia de proteínas que únicamente se encuentra en las Brassicaceae (Yamada et al., 2008). En Arabidopsis, esta proteína está codificada por el gen *NAI2* que se expresa en toda la planta, pero preferencialmente en la raíz. La proteína está localizada en los cuerpos del retículo endoplásmico, y participa en su formación, regulando su número y forma. Además, TSA1-like está involucrada en la acumulación de la proteína PYK10, una β -glucosidasa que porta la señal de retención KDEL, un péptido señal (Lys-Asp-Glu-Leu) que dirige a las proteínas desde otros lugares al retículo endoplasmático; sin embargo, no está involucrada en su transcripción (Yamada et al., 2008). No se reportan cambios morfológicos en Arabidopsis por efecto de la mutación de *nai2*, lo que sugiere que el gen *NAI2* no está involucrado en el control del crecimiento (Yamada et al., 2009). Sin embargo, en raíces de Arabidopsis se ha visto que la proteína TSA1-like responde a estrés salino, aumentando su abundancia a las 6 y 48 h de exposición de 150 mM NaCl (Jiang et al., 2007). Se puede ver que la abundancia de la TSA1-like se altera en todos los fondos genéticos estudiados, aunque en mayor medida en las mutantes *xal2-2* y *xal2-2 agl24-4* y *soc1-6* (Figura 17). De manera interesante podemos observar que la mutante doble *xal2-2 soc1-6* tiene una mayor abundancia que los parentales casi igual a la planta silvestre (Figura 17).

***XAL2* regula positivamente la traducción de la GSTF9.** La proteína 2, fue identificada como glutation S-transferasa F 9 (GSTF9), que es una proteína constitutiva, localizada en el citosol y en el cloroplasto (Dixon y Edwards, 2009). GSTF9, pertenece a la superfamilia GST que, en Arabidopsis, está compuesta por 54 proteínas solubles y una proteína de membrana. La superfamilia GST se divide en varias clases: zeta, theta, TCHQD, phi, tau, y lambda (Dixon y Edwards, 2010). La proteína GSTF9 pertenece a la clase phi que anteriormente estaba clasificada dentro de la clase teta o era llamada GST Tipo I, que es una de las tres clases de GSTs que se encuentran específicamente en plantas y también es la segunda clase más numerosa, compuesta por 13 genes (Rahantaniaina et al., 2013). Además, es una proteína abundante y ha sido reportada como altamente detectable en análisis de proteómica (Sapp et al., 2004; Wagner et al., 2002). Se ha reportado que los genes que codifican para las proteínas GSTF son altamente inducibles por exposición a factores de estrés como el ácido salicílico (GSTF6; Sappl et al., 2004; Uquillas et al., 2004), H₂O₂ (GSTF8; Chen et al., 1996;

Horváth et al., 2019) e infección por patógenos (Jones et al., 2004). No obstante, se sabe muy poco acerca de su función; ni siquiera en mutantes múltiples (*gstf6 gstf7 gstf9 gstf10*) presentan una alteración en el fenotipo (Horváth et al., 2019; Sappl et al., 2009). Las GSTs son enzimas que típicamente presentan actividad de conjugación, transferencia y de peroxidasa dependiente de glutatión. Para la actividad peroxidasa, las GSTs usan el glutatión reducido (GSH) para catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂), moléculas pequeñas o la desglutinationilación de los residuos de cisteína de las proteínas (Dixon y Edwards, 2010a; Rahantaniaina et al., 2013; Wagner et al., 2002). La diversificación en función de estas enzimas en las plantas ha sido revisada exhaustivamente por Dixon y Edwards (2010a).

El gen que codifica a GSTF9 (*GSTF9*) ha sido reportado con un gen de repuesta a estrés debido a que es inducido por NaCl y ácido salicílico (Sappl et al., 2004; Wagner et al., 2002). La pérdida de función de *gstf9* produce una disminución en la actividad GPOX, y una mayor acumulación de ácido ascórbico y de GSH en condiciones control, mientras que en exposición a ácido salicílico causa un aumento mayor en los niveles de H₂O₂ (Horváth et al., 2015). Lo anterior indica que *GSTF9* juega un papel en la homeostasis en el estado de reducción-oxidación (Horváth et al., 2015).

Nuestros resultados muestran que GSTF9 es regulada positivamente por *XAL2* y negativamente por *AGL24* y por *SOC1*. La abundancia de GSTF9 aumenta en las dos mutantes dobles *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* con respecto a Col-0, menos que en *agl24-4* y de forma similar al de *soc1-6*, respectivamente (Figura 17). Lo cual sugiere que *soc1-6* es epistático sobre *xal2-2*. Lo anterior indica que *AGL24* y *SOC1* regulan de forma opuesta a *XAL2* la abundancia de GSTF9 en la raíz primaria. Adicionalmente, de manera interesante, los niveles de transcritos de *GSTF9* en *xal2-2* exhiben una disminución con respecto a los de Col-0, indicando que *XAL2* tiene un efecto positivo sobre la regulación transcripcional de *GSTF9* (Zluhan-Martínez et al., datos no publicados). Así mismo en trabajos futuros sería interesante probar el efecto de *AGL24* y *SOC1* y de su interacción genética con *XAL2* sobre la expresión transcripcional de *GSTF9*, en las líneas mutantes *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* (Figura 17).

***XAL2* regula negativamente la abundancia de la proteína de T3P18_4, mientras que *AGL24* y *SOC1* la regulan positivamente.** La proteína 3 (Figura 18) fue identificada como una T3P18_4 que es una proteína vacuolar calcium-binding protein-like, clasificada en Gene Ontology como un componente en la señalización del Ca²⁺ (Cuadro 3). En mutantes de *xal2-2* la abundancia

de T3P18_4 se aumentó mientras que en *agl24-4*, *soc1-6*, *xal2-2 agl24-4* y *xal2-2 soc1-6* disminuyó, con respecto a Col-0 (Figura 17). Lo que sugiere que, *XAL2* participa negativamente en la acumulación de T3P18_4, mientras que *AGL24* y *SOC1* lo hacen de forma positiva. Análisis de proteómica reportan un aumento de T3P18_4 en respuesta a estrés salino y estrés por cadmio (Jiang et al., 2007; Sarry et al., 2006). *XAL2* únicamente regula la abundancia de la proteína, pero no regula su expresión, puesto que los niveles mRNA de *T3P18_4* no son similares a los de Col-0 (Zluhan-Martínez et al., datos no publicados).

Por otro lado la proteína 4, identificada como una 60S acidic ribosomal protein P0, pertenece a la familia ribosomal protein L10 P. Participa en la biosíntesis del ribosoma y es una proteína candidata como sustrato de fosforilación de SnRK2 en respuesta a ABA (100 μ M) en maíz (Wang et al., 2018a). Nuestras cuantificaciones indican que la 60S acidic ribosomal protein P0 aumentó drásticamente en *xal2-2* y disminuyó en *agl24-4* y *soc1-6*. En la mutante doble *xal2-2 agl24-4* también se ve una acumulación de la proteína como en la de *xal2-2* aunque es menor. Mientras que por, la abundancia de la proteína es intermedia en la doble mutante *soc1-6 xal2-2* con respecto a sus parentales (Figura 17).

La pérdida de función de *xal2-2* aumenta la abundancia de la proteína A0A178UHL8_ARATH, codificada *FQR1*. La proteína 5 es una quinona reductasa de tipo flavodoxina de unión a mononucleótidos de flavina. A0A178UHL8_ARATH está codificada por el gen *FLAVODOXIN-like QUINONE REDUCTASE 1 (FQR1)*, que es un gen involucrado en la respuesta celular al estímulo de auxinas y a los procesos de oxidación-reducción y cuya expresión aumenta con la aplicación del ácido indol-3-acético (Laskowski et al., 2002). FQR1 cataliza la transferencia de electrones de NADH y NADPH a varios sustratos y exhibe actividad de quinona reductasa como enzimas de desintoxicación, posiblemente para proteger contra el estrés oxidativo (Laskowski et al., 2002). De manera interesante, se observó la presencia de la proteína 5 en los geles de las mutantes de *xal2-2* y *xal2-2 soc1-6*, mientras que en el gel de Col-0 no se presenta, y en el de los demás genotipos su presencia es muy ligera (Figura 17).

Finalmente, la proteína 6, identificada como Q9SUR0-ARATH pertenece a la superfamilia de transporte de lípidos Proteína policetida ciclasa/deshidrasa (POLYKETIDE CYCLASE/DEHYDRASE AND LIPID TRANSPORT SUPERFAMILY PROTEIN).

La pérdida de función de *xal2-2* aumenta la abundancia de las proteínas 4, 5 y 6 (Figura 17). No obstante, de manera similar que las proteínas 1 y 3, las proteínas 4, 5 y 6 no son reguladas de

manera transcripcional por *XAL2* (Zluhan-Martínez et al., datos no publicados). Los datos anteriores implican que *XAL2* podría estar regulándolas a través de proteínas intermediarias que dirijan su transcripción o la estabilidad de la proteína, pero no directamente. En cambio, *XAL2* sí regula la transcripción del gen de la proteína 6 (*GSTF9*).

La mayoría de estas seis proteínas afectadas por la pérdida de función de *xal2-2* han sido relacionadas o responden a diferentes factores de estrés en reportes previos (Jiang et al., 2007; Laskowski et al., 2002; Sarry et al., 2006; Sirichandra et al., 2009). Lo cual sugiere que la pérdida de función de *xal2-2* pudiera generar un estado celular similar al estrés, y que *XAL2* podría estar involucrado en modular las respuestas al estrés.

Por lo tanto, el efecto de *XAL2* sobre la expresión de *GSTF9*, podría tener implicaciones en el mantenimiento de la homeostasis del estado redox durante el desarrollo post germinatorio de la raíz primaria. Resultados del laboratorio indican que las mutantes *xal2-2* presentaron un aumento en la tinción con DAB diaminobenzidina en el meristemo apical de la raíz, con respecto a Col-0; lo cual refleja un aumento en la concentración de H₂O₂ (Zluhan-Martínez et al., datos no publicados). Lo anterior indica que *XAL2* tiene un efecto positivo en la regulación de los niveles de H₂O₂, y la homeostasis de redox en el meristemo de la raíz primaria, posiblemente de manera dependiente de *GSTF9*.

5. CONCLUSIONES

En esta investigación caracterizamos el efecto de *AGL24* y *SOCI* y de su interacción genética con *XAL2* sobre el crecimiento en longitud de la raíz primaria en condiciones óptimas y en condiciones de estrés osmótico severo. El análisis de la longitud celular de una hilera de la corteza en sentido basípeto (del ápice a la base) de la raíz nos permitió precisar la localización en la zona de crecimiento de la raíz donde *AGL24* y *SOCI*, y su interacción genética con *XAL2*, ejercen su efecto para modular el tamaño final de la raíz primaria.

Nuestros resultados indican que tanto *SOCI* como *AGL24*, participan en el desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis*, regulando el crecimiento de manera negativa, como represores, de forma opuesta y parcialmente independiente de *XAL2*. Se propone que el efecto de *SOCI* y *AGL24*, opuesto al de *XAL2*, sobre la producción celular y la elongación, permiten un balance y compensan parcialmente el crecimiento de la raíz primaria. Lo cual contrasta con la función redundante de *XAL2* con *AGL24* y *SOCI* observada en la parte aérea durante la transición a la floración, reportada en la

literatura. Por un lado, corroboramos que *XAL2* regula el crecimiento a través de los procesos de producción y elongación celular. A su vez, demostramos que *AGL24* inhibe la elongación. No obstante, esto solo pudo ser evidenciado en ausencia de la actividad de *XAL2* en la mutante doble, donde *XAL2* y *AGL24* regulan de manera opuesta la elongación celular. Lo cual es consistente con la compensación en el crecimiento de la raíz primaria, mientras que *xal2-2* es epistático a *agl24-4* sobre el control del tamaño del meristemo. Además, *SOCI* también inhibe la elongación celular, regulación opuesta a la de *XAL2*, mientras que *SOCI* está por abajo de *XAL2* en la modulación de la proliferación celular. Por lo anterior, la interacción genética entre *AGL24* y *XAL2* o entre *SOCI* y *XAL2* varía dependiendo del proceso celular.

En otro aspecto, también demostramos que de los genes *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* participan en la modulación de la longitud de la raíz primaria en respuesta a estrés osmótico severo ($\Psi_0 = -0.85$ MPa). En condiciones de estrés osmótico *XAL2* también está involucrado en el mantener el crecimiento del meristemo. Además, en estrés osmótico, la interacción entre *XAL2* y *AGL24* se modifica: *XAL2* está por abajo de *AGL24* en la vía de la regulación del tamaño de la zona de elongación. En condiciones de estrés, la interacción entre los genes *SOCI* y *XAL2* también se modifica, *SOCI* está por abajo de *XAL2* en la modulación de la producción y la elongación celular.

Lo anterior revela que *SOCI* y *AGL24* tienen funciones similares, como la inhibición de la elongación celular, pero al mismo tiempo presentan funciones distintas en la raíz primaria, como la modulación de la proliferación celular, y su interacción genética con *XAL2*. Lo cual, varía dependiendo de la disponibilidad de agua en el medio. Es posible que estos dos genes MADS-box tengan una función redundante o parcialmente redundante en la raíz primaria, como ha sido demostrado por otros autores para la parte aérea. Estos resultados son novedosos e inesperados, porque la función de *AGL24* y *SOCI* está ampliamente asociada al comportamiento del meristemo apical y no se había pensado su posible interacción con genes claramente involucrados en la respuesta de la raíz. Por lo cual, nuestros hallazgos sugieren un mayor el alcance funcional de estos reguladores multifuncionales. No obstante, en trabajos futuros se requiere determinar la expresión espacio-tempo-ambiental de *XAL2*, *AGL24* y *SOCI* mediante marcadores transcripcionales y traduccionales, para dar una mayor claridad y sustento al análisis funcional en respuesta al estrés osmótico.

Así mismo, en este estudio se comprobó que los genes *AGL24*, *SOCI* y *XAL2* participan en la respuesta ante concentraciones de ácido abscísico (ABA) inhibitorias del crecimiento de la raíz. No obstante, la interacción genética de *AGL24* y *XAL2* en la modulación del desarrollo de la raíz primaria

en condiciones de estrés osmótico no parece estar mediada por el ABA, pues la doble mutante *xal2-2 agl24-4* responde distinto a manitol 300 mM que a ABA 10 μ M. Por otro lado, parece que *AGL24* es el gen que menos participa en esta respuesta de estimulación del crecimiento mediada por ABA 0.1 μ M y se requiere de la interacción entre los genes *SOC1* y *XAL2* para tener el efecto estimulante que se ve en la planta silvestre. Además, el crecimiento de la raíz de *agl24-4* levemente más sensible a tratamiento con fluridona (un inhibidor de la biosíntesis de ABA), lo cual evidenció que la regulación del crecimiento mediado por *AGL24*, sugiriendo que en condiciones óptimas de crecimiento podría ser dependiente de ABA. Sin embargo, queda por aclarar en qué paso de la vía de señalización del ABA están involucrados *AGL24*, *SOC1* y *XAL2*.

Finalmente, mediante el análisis visual de cambios en la abundancia de las proteínas del ápice de la raíz primaria en SDS-PAGE, pudimos reconocer seis proteínas afectadas por la pérdida de función de *xal2-2*. La identificación por espectrometría de masas reveló que son GSTF9, TSA1-like, T3P18_4, 60S acidic ribosomal protein P0, A0A178UHL8_ARATH y Q9SUR0-ARATH. Un trabajo paralelo a esta tesis realizado en nuestro laboratorio por Zluhan-Martínez et al. (datos sin publicar) corroboró que sólo la expresión transcripcional de *GSTF9* es afectada, regulada positivamente por *XAL2*; además, la raíz primaria de las mutantes *xal2-2* mostraron un aumento en la concentración de H_2O_2 . Esto sugiere que *GSTF9* posiblemente es un componente en la red de regulación del crecimiento de la raíz en la que participa *XAL2*, y que este último está involucrado en la regulación de la homeostasis redox en la raíz, mediante el mantenimiento de concentraciones adecuadas de H_2O_2 .

6. LITERATURA CITADA

- Agarwal, P. K., and Jha, B. (2010). Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biol. Plant.* 54, 201–212. doi:10.1007/s10535-010-0038-7.
- Agrawal, G. K., and Thelen, J. J. (2009). A high-resolution two dimensional Gel- and Pro-Q DPS-based proteomics workflow for phosphoprotein identification and quantitative profiling. *Methods Mol. Biol.* 527, 3–19. doi:10.1007/978-1-60327-834-8_1.
- Álvarez-Buylla, E. R., García-Ponce, B., Sánchez, M. de la P., Espinosa-Soto, C., García-Gómez, M. L., Piñeyro-Nelson, A., et al. (2019). MADS-box genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms. *New Phytol.* 223, 1143–1158. doi:10.1111/nph.15793.
- Álvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., et al. (2000a). MADS-box gene evolution beyond flowers: Expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J.* 24, 457–466. doi:10.1046/j.1365-313X.2000.00891.x.
- Álvarez-Buylla, E. R., Pelaz, S., Liljegren, S. J., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., et al. (2000b). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.97.10.5328.
- Anderson, M., and Wilson, F. (2000). Growth, maintenance, and use of Arabidopsis genetic resources. *Arab. A Pract. Approach.* 223, 1–28. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10028053943/> [Accessed September 2, 2019].
- Antoniadi, I., Plačková, L., Simonovik, B., Doležal, K., Turnbull, C., Ljung, K., et al. (2015). Cell-type-specific cytokinin distribution within the arabidopsis primary root apex. *Plant Cell* 27, 1955–1967. doi:10.1105/tpc.15.00176.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- Armstrong, R. N., Morgenstern, R., and Board, P. G. (2017). “Glutathione Transferases,” in *Comprehensive Toxicology: Third Edition* (American Society of Plant Biologists), 326–362. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64296-4.
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A., Singh, V., Tyagi, A. K., et al. (2007). MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics* 8, 242. doi:10.1186/1471-2164-8-242.
- Bai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Song, C., and Cao, M. (2007). Hydrogen peroxide modulates abscisic acid signaling in root growth and development in Arabidopsis. *Chinese Sci. Bull.* 52, 1142–1145. doi:10.1007/s11434-007-0179-z.
- Bartels, D., and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* doi:10.1080/07352680590910410.
- Beemster, G. T., and Baskin, T. I. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 116, 1515–26. doi:10.1104/pp.116.4.1515.
- Beemster, G. T. S. (2019). Cellular dynamics, a systems biology bottleneck. *Trends Plant Sci.* 24, 386–388. doi:10.1016/j.tplants.2019.03.004.
- Beemster, G. T. S., and Baskin, T. I. (2000). *STUNTED PLANT 1* Mediates Effects of Cytokinin, But Not of Auxin, on Cell Division and Expansion in the Root of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 124, 1718–1727. doi:10.1104/pp.124.4.1718.
- Beemster, G. T. S., De Vusser, K., De Tavernier, E., De Bock, K., and Inzé, D. (2002). Variation in growth rate between Arabidopsis ecotypes is correlated with cell division and A-type Cyclin-

- Dependent Kinase Activity. *Plant Physiol.* 129, 854–864. doi:10.1104/pp.002923.
- Bennett, T., and Scheres, B. (2010). “Root development—two meristems for the price of one?,” in *Current Topics in Developmental Biology*, 67–102. doi:10.1016/S0070-2153(10)91003-X.
- Bezerra, I. C., Michaels, S. D., Schomburg, F. M., and Amasino, R. M. (2004). Lesions in the mRNA cap-binding gene ABA HYPERSENSITIVE 1 suppress FRIGIDA-mediated delayed flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 40, 112–119. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02194.x.
- Bhaskara, G. B., Nguyen, T. T., and Verslues, P. E. (2012). Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade a protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol.* 160, 379–395. doi:10.1104/pp.112.202408.
- Bhaskara, G. B., Yang, T.-H., and Verslues, P. E. (2015). Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water-limited environments. *Front. Plant Sci.* 6, 323–336. doi:10.1016/B978-0-12-812689-9.00016-9.
- Bielach, A., Hrtyan, M., and Tognetti, V. B. (2017). Plants under stress: involvement of auxin and cytokinin. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18071427.
- Bizet, F., Hummel, I., and Bogeat-Triboulot, M. B. (2015). Length and activity of the root apical meristem revealed in vivo by infrared imaging. *J. Exp. Bot.* 66, 1387–1395. doi:10.1093/jxb/eru488.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Heidstra, R., et al. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. 39–44.
- Blum, A., and Tuberosa, R. (2018). Dehydration survival of crop plants and its measurement. *J. Exp. Bot.* 69, 975–981. doi:10.1093/jxb/erx445.
- Böhmer, M., and Schroeder, J. I. (2011). Quantitative transcriptomic analysis of abscisic acid-induced and reactive oxygen species-dependent expression changes and proteomic profiling in Arabidopsis suspension cells. *Plant J.* 67, 105–118. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04579.x.
- Bolger, A. M., Poorter, H., Dumschott, K., Bolger, M. E., Arend, D., Osorio, S., et al. (2019). Computational aspects underlying genome to phenome analysis in plants. *Plant J.* 97, 182–198. doi:10.1111/tpj.14179.
- Bouché, F., D’Aloia, M., Tocquin, P., Lobet, G., Detry, N., and Périlleux, C. (2016). Integrating roots into a whole plant network of flowering time genes in Arabidopsis thaliana. *Sci. Rep.* 6, 29042. doi:10.1038/srep29042.
- Boudsocq, M., and Laurière, C. (2005). Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.* 138, 1185–1194. doi:10.1104/pp.105.061275.
- Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science (80-)*. 218, 443–448. doi:10.1126/science.218.4571.443.
- Brambilla, V., Battaglia, R., Colombo, M., Masiero, S., Bencivenga, S., Kater, M. M., et al. (2007). Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2544–56. doi:10.1105/tpc.107.051797.
- Burgeff, C., Liljegren, S. J., Tapia-López, R., Yanofsky, M. F., and Alvarez-Buylla, E. R. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of Arabidopsis thaliana roots. *Planta* 214, 365–372. doi:10.1007/s004250100637.
- Cajero-Sánchez, W. (2018). Análisis de la respuesta a estrés osmótico de diferentes genotipos de Arabidopsis thaliana usando a la raíz como sistema modelo. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. 109p.
- Cajero-Sánchez, W., García-Ponce, B., Sánchez, M. de la P., Álvarez-Buylla, E. R., and Garay-Arroyo, A. (2018). Identifying the transition to the maturation zone in three ecotypes of Arabidopsis thaliana roots. *Commun. Integr. Biol.* 11, e1395993. doi:10.1080/19420889.2017.1395993.

- Castelán-Muñoz, N., Herrera, J., Cajero-Sánchez, W., Arrizubieta, M., Trejo, C., García-Ponce, B., et al. (2019). MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants. *Front. Plant Sci.* 10, 853. doi:10.3389/fpls.2019.00853.
- Castelán-Muñoz, N., Jiménez-Casas, M., López-Delgado, H. A., Campos-García, H., and Vargas-Hernández, J. J. (2015). Variación familiar en plántulas de *Pinus leiophylla* Schiede ex Schtdl. & Cham. en respuesta a la sequía: potencial hídrico y osmótico. *Rev. Chapingo, Ser. Ciencias For. y del Ambient.* 21, 295–306. doi:10.5154/r.rchscfa.2014.10.043.
- Cerón-Bustamante, M. (2012). Estudio del gen AGAMOUS-like 19 (AGL19) en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 62p.
- Chávez Montes, R. A., Coello, G., González-Aguilera, K. L., Marsch-Martínez, N., de Folter, S., and Álvarez-Buylla, E. R. (2014). ARACNe-based inference, using curated microarray data, of *Arabidopsis thaliana* root transcriptional regulatory networks. *BMC Plant Biol.* 14, 97. doi:10.1186/1471-2229-14-97.
- Chen, T., and Fluhr, R. (2018). Singlet oxygen plays an essential role in the root's response to osmotic stress. *Plant Physiol.* 177, 1717–1727. doi:10.1104/pp.18.00634.
- Chen, W., Chao, G., and Singh, K. B. (1996). The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J.* 10, 955–966. doi:10.1046/j.1365-313X.1996.10060955.x.
- Cho, S., Jang, S., Chae, S., Chung, K. M., and Moon, Y. (1999). Analysis of the C-terminal region of *Arabidopsis thaliana* APETALA1 as a transcription activation domain. doi:10.1023/A.
- Chon, W., Provart, N. J., Glazebrook, J., Katagiri, F., Chang, H. S., Eulgem, T., et al. (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14, 559–574. doi:10.1105/tpc.010410.
- Christensen, C. A., and Feldmann, K. A. (2007). “Biotechnology approaches to engineering drought tolerant crop,” in *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (Dordrecht: Springer Netherlands), 333–357. doi:10.1007/978-1-4020-5578-2_14.
- Christmann, A., Hoffmann, T., Teplova, I., Grill, E., and Müller, A. (2005). Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137, 209–219. doi:10.1104/pp.104.053082.
- Considine, M. J., and Foyer, C. H. (2014). Redox Regulation of Plant Development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1305–1326. doi:10.1089/ars.2013.5665.
- Cosio, C., Vuillemin, L., De Meyer, M., Kevers, C., Penel, C., and Dunand, C. (2009). An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity. *Planta* 229, 823–836. doi:10.1007/s00425-008-0876-0.
- Creelman, R. A., Mason, H. S., Bensen, R. J., Boyer, J. S., and Mullet, J. E. (1990). Water Deficit and Abscisic Acid Cause Differential Inhibition of Shoot versus Root Growth in Soybean Seedlings : Analysis of Growth, Sugar Accumulation, and Gene Expression. *Plant Physiol.* 92, 205–14. doi:10.1104/pp.92.1.205.
- Cui, L. G., Shan, J. X., Shi, M., Gao, J. P., and Lin, H. X. (2014). The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J.* 80, 1108–1117. doi:10.1111/tbj.12712.
- Davies, W. J., and Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of

- plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 55–76. doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.000415.
- De Folter, S., Immink, R. G. H., Kieffer, M., Pařenicová, L., Henz, S. R., Weigel, D., et al. (2005). Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS box transcription factors. *Plant Cell* 17, 1424–1433. doi:10.1105/tpc.105.031831.
- De Tullio, M. C., Jiang, K., and Feldman, L. J. (2010). Redox regulation of root apical meristem organization: Connecting root development to its environment. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 328–336. doi:10.1016/j.plaphy.2009.11.005.
- De Veylder, L., Beemster, G. T. S., Beeckman, T., and Inzé, D. (2001). CKS1At overexpression in Arabidopsis thaliana inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J.* 25, 617–626. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.00996.x.
- Deak, K. I., Malamy, J., and Genetics, M. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. 17–28. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02425.x.
- Déjardin, A., Sokolov, L. N., and Kleczkowski, L. A. (1999). Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in Arabidopsis. *Biochem. J.* 344 Pt 2, 503–9. doi:10.1042/BJ3440503.
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., et al. (2007). Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17, 678–682. doi:10.1016/j.cub.2007.02.047.
- Dinneny, J. R., Long, T. A., Wang, J. Y., Jung, J. W., Mace, D., Pointer, S., et al. (2008). Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science* 320, 942–5. doi:10.1126/science.1153795.
- Dixon, D. P., and Edwards, R. (2010). Roles for stress-inducible lambda glutathione transferases in flavonoid metabolism in plants as identified by ligand fishing. *J. Biol. Chem.* 285, 36322–36329. doi:10.1074/jbc.M110.164806.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., et al. (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 119, 71–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8275865> [Accessed September 2, 2019].
- Dong, T., Xu, Z. Y., Park, Y., Kim, D. H., Lee, Y., and Hwang, I. (2014). Abscisic acid uridine diphosphate glucosyltransferases play a crucial role in abscisic acid homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 165, 277–289. doi:10.1104/pp.114.239210.
- Drisch, R. C., and Stahl, Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* 6, 1–8. doi:10.3389/fpls.2015.00505.
- Du, H., Huang, F., Wu, N., Li, X., Hu, H., and Xiong, L. (2018). Integrative regulation of drought escape through ABA-dependent and independent pathways in rice. *Mol. Plant* 11, 584–597. doi:10.1016/j.molp.2018.01.004.
- Dunand, C., Crèvecoeur, M., and Penel, C. (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in Arabidopsis root and their influence on root development: Possible interaction with peroxidases. *New Phytol.* doi:10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x.
- Durand, M., Porcheron, B., Hennion, N., Maurousset, L., Lemoine, R., and Pourtau, N. (2016). Water deficit enhances C export to the roots in Arabidopsis thaliana plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant Physiol.* 170, 1460–1479. doi:10.1104/pp.15.01926.
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., and Sommer, H. (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in Antirrhinum majus. *EMBO J.* 18, 5370–5379. doi:10.1093/emboj/18.19.5370.

- Ephritikhine, G., Fellner, M., Vannini, C., Lapous, D., and Barbier-Brygoo, H. (1999). The sax1 dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. *Plant J.* 18, 303–314. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00454.x.
- Evans, M. L. (1984). “Functions of hormones at the cellular level of organization,” in *Hormonal Regulation of Development II* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 23–79. doi:10.1007/978-3-642-67731-1_3.
- Fan, H., Hu, Y., Tudor, M., and Ma, H. (1997). Specific interactions between the K domains of AG and AGLs , members of the MADS domain family of DNA binding proteins. 12, 999–1010.
- Fang, S. C., and Fernandez, D. E. (2002). Effect of regulated overexpression of the MADS domain factor AGL15 on flower senescence and fruit maturation. *Plant Physiol.* 130, 78–89. doi:10.1104/pp.004721.
- Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., and Dinneny, J. R. (2016). Growing out of stress: The role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *Plant Cell* 28, 1769–1782. doi:10.1105/tpc.16.00182.
- Finkelstein, R., Gampala, S. S. L., Lynch, T. J., Thomas, T. L., and Rock, C. D. (2005). Redundant and distinct functions of the ABA response loci ABA-insensitive(ABI)5 and ABRE-binding factor (ABF)3. *Plant Mol. Biol.* 59, 253–267. doi:10.1007/s11103-005-8767-2.
- Fong, F., Smith, J. D., and Koehler, D. E. (1983). Early events in maize seed development. *Plant Physiol.* 73, 899–901. doi:10.1104/pp.73.4.899.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Angel, M., et al. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. 422, 442–446.
- Fornara, F., and Coupland, G. (2009). Plant Phase Transitions Make a SPLash. *Cell* 138, 625–627. doi:10.1016/j.cell.2009.08.011.
- Foyer, C. H. (2018). Reactive oxygen species , oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environ. Exp. Bot.* 154, 134–142. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.05.003.
- Foyer, C. H., Wilson, M. H., and Wright, M. H. (2018). Redox regulation of cell proliferation: Bioinformatics and redox proteomics approaches to identify redox-sensitive cell cycle regulators. *Free Radic. Biol. Med.* 122, 137–149. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.047.
- Fu, Y., Yang, Y., Chen, S., Ning, N., and Hu, H. (2019). Arabidopsis IAR4 Modulates Primary Root Growth Under Salt Stress Through ROS-Mediated Modulation of Auxin Distribution. *Front. Plant Sci.* 10, 522. doi:10.3389/fpls.2019.00522.
- Fujii, H., Verslues, P. E., and Zhu, J.-K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 485–94. doi:10.1105/tpc.106.048538.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124, 509–525. doi:10.1007/s10265-011-0412-3.
- Gan, Y. B., Zhou, Z. J., An, L. J., Bao, S. J., Liu, Q., Srinivasan, M., et al. (2010). The effects of fluctuations in the nutrient supply on the expression of ANR1 and 11 other MADS box genes in shoots and roots of *Arabidopsis thaliana*. *Botany-Botanique* 88, 1023–1031. doi:10.1139/B10-075.
- Gan, Y., Bernreiter, A., Filleur, S., Abram, B., and Forde, B. G. (2012). Overexpressing the ANR1 MADS-box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development. *Plant Cell Physiol.* 53, 1003–1016. doi:10.1093/pcp/pcs050.
- Gan, Y. bo, Zhou, Z. jing, An, L. jun, Bao, S. jie, and Forde, B. G. (2011). A Comparison Between

Northern Blotting and Quantitative Real-Time PCR as a Means of Detecting the Nutritional Regulation of Genes Expressed in Roots of *Arabidopsis thaliana*. *Agric. Sci. China* 10, 335–342. doi:10.1016/S1671-2927(11)60012-6.

- 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. doi:10.1007/s00425-005-0020-3.
- Gao, S., Gao, J., Zhu, X., Song, Y., Li, Z., Ren, G., et al. (2016). ABF2, ABF3, and ABF4 Promote ABA-Mediated Chlorophyll Degradation and Leaf Senescence by Transcriptional Activation of Chlorophyll Catabolic Genes and Senescence-Associated Genes in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 9, 1272–1285. doi:10.1016/j.molp.2016.06.006.
- Garay-Arroyo, A., De La Paz Sánchez, M., García-Ponce, B., Azpeitia, E., and Álvarez-Buylla, E. R. (2012). Hormone symphony during root growth and development. *Dev. Dyn.* 241, 1867–1885. doi:10.1002/dvdy.23878.
- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., et al. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during *Arabidopsis* root development by regulating PIN expression. *EMBO J.* 32, 2884–2895. doi:10.1038/emboj.2013.216.
- Gazarian, I. G., Lagrimini, L. M., Mellon, F. A., Naldrett, M. J., Ashby, G. A., and Thorneley, R. N. (1998). Identification of skatolyl hydroperoxide and its role in the peroxidase-catalysed oxidation of indol-3-yl acetic acid. *Biochem. J.* 333 (Pt 1), 223–32. doi:10.1042/bj3330223.
- Geng, Y., Wu, R., Wee, C., Xie, F., Wei, X., ... P. C.-T. P., et al. A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis*. *Am Soc Plant Biol.* Available at: <http://www.plantcell.org/content/25/6/2132.short> [Accessed September 18, 2019].
- Gimenez, C., Gallardo, M., and Thompson, R. (2005). “Plant-water reations,” in *Encyclopedia of Soils in the Environment*, eds. D. Hillel and J. L. Hatfield (Elsevier/Academic Press), 669. doi:10.1097/01.ss.0000178203.51170.63.
- Gonzalez, D. H. (2016). “Introduction to transcription factor structure and function,” in *Plant Transcription Factors* (Academic Press), 3–11. doi:10.1016/B978-0-12-800854-6/00001-4.
- Hacham, Y., Holland, N., Butterfield, C., Ubeda-Tomas, S., Bennett, M. J., Chory, J., et al. (2011). Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* 138, 839–848. doi:10.1242/dev.061804.
- Hauser, F., Li, Z., Waadt, R., and Schroeder, J. I. (2017). SnapShot: Abscisic Acid Signaling. *Cell* 171, 1708–1708.e0. doi:10.1016/j.cell.2017.11.045.
- Hayes, T. E., Sengupta, P., and Cochran, B. H. (1988). The human c-fos serum response factor and the yeast factors GRM/PRTF have related DNA-binding specificities. *Genes Dev.* 2, 1713–1722. doi:10.1101/gad.2.12b.1713.
- He, J., Duan, Y., Hua, D., Fan, G., Wang, L., Liu, Y., et al. (2012). DEXH box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in *Arabidopsis* mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *Plant Cell* 24, 1815–33. doi:10.1105/tpc.112.098707.
- Heja, Æ. J., and Benkova, E. (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. 383–396. doi:10.1007/s11103-008-9393-6.
- Henschel, K., Kofuji, R., Hasebe, M., Saedler, H., Münster, T., and Theißen, G. (2002). Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Biol. Evol.* 19, 801–814. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a004137.
- 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. doi:10.1093/emboj/cdf432.

- Herath, V. (2018). “Transcription factors based genetic engineering for abiotic tolerance in crops,” in *Biochemical, Physiological and Molecular Avenues for Combating Abiotic Stress Tolerance in Plants* (Academic Press), 1–15. doi:10.1016/b978-0-12-813066-7.00001-2.
- Hong, J. H., Seah, S. W., and Xu, J. (2013). The root of ABA action in environmental stress response. *Plant Cell Rep.* 32, 971–983. doi:10.1007/s00299-013-1439-9.
- Horváth, E., Bela, K., Holinka, B., Riyazuddin, R., Gallé, Á., Hajnal, Á., et al. (2019). The Arabidopsis glutathione transferases, AtGSTF8 and AtGSTU19 are involved in the maintenance of root redox homeostasis affecting meristem size and salt stress sensitivity. *Plant Sci.* 283, 366–374. doi:10.1016/J.PLANTSCI.2019.02.005.
- Horváth, E., Bela, K., Papdi, C., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., et al. (2015). The role of Arabidopsis glutathione transferase F9 gene under oxidative stress in seedlings. *Acta Biol. Hung.* 66, 406–418. doi:10.1556/018.66.2015.4.5.
- Hsiao, T. C., and Xu, L. K. (2000). Sensitivity of with of roots versus leaves to water stress: Biophysical analysis and relation to water. *J. Exp. Bot.* 51, 1595–1616. doi:10.1093/jexbot/51.350.1595.
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., et al. (2010). Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: An integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiol.* 154, 357–372. doi:10.1104/pp.110.157008.
- Hwang, K., Susila, H., Nasim, Z., Jung, J. Y., and Ahn, J. H. (2019). Arabidopsis ABF3 and ABF4 transcription factors act with the NF-YC complex to regulate SOC1 expression and mediate drought-accelerated flowering. *Mol. Plant* 12, 489–505. doi:10.1016/j.molp.2019.01.002.
- Immink, R. G., Gadella, T. W., Ferrario, S., Busscher, M., and Angenent, G. C. (2002). Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2416–2421. doi:10.1073/pnas.042677699.
- Immink, R. G. H., Posé, D., Ferrario, S., Ott, F., Kaufmann, K., Valentim, F. L., et al. (2012). Characterization of SOC1’s central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators. *Plant Physiol.* 160, 433–449. doi:10.1104/pp.112.202614.
- Immink, R. G., Tonaco, I. A., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A. D., Busscher-Lange, J., et al. (2009). SEPALLATA3: the “glue” for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol.* 10, R24. doi:10.1186/gb-2009-10-2-r24.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., and Zhu, J. K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* 9, 1935–1949. doi:10.1105/tpc.9.11.1935.
- Ivanov, V. B., and Dubrovsky, J. G. (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 root growth. *Int. J. Plant Sci.* 158, 757–763. doi:10.1086/297487.
- Ivanov, V. B., and Dubrovsky, J. G. (2013). Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* 18, 237–243. doi:10.1016/J.TPLANTS.2012.10.002.
- Jetha, K., Theißen, G., and Melzer, R. (2014). Arabidopsis SEPALLATA proteins differ in cooperative DNA-binding during the formation of floral quartet-like complexes. *Nucleic Acids Res.* 42, 10927–10942. doi:10.1093/nar/gku755.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., and Deyholos, M. K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.* 58, 3591–3607. doi:10.1093/jxb/erm207.
- Jiao, Y., Sun, L., Song, Y., Wang, L., Liu, L., Zhang, L., et al. (2013). AtrbohD and AtrbohF

- positively regulate abscisic acid-inhibited primary root growth by affecting Ca²⁺ signalling and auxin response of roots in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 64, 4183–4192. doi:10.1093/jxb/ert228.
- Jones, A. M. ., Thomas, V., Truman, B., Lilley, K., Mansfield, J., and Grant, M. (2004). Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry* 65, 1805–1816. doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2004.04.005.
- Kang, J. Y., Choi, H. I., Im, M. Y., and Kim, S. Y. (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress- responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14, 343–357. doi:10.1105/tpc.010362.tase.
- Kärkönen, A., and Kuchitsu, K. (2015). Phytochemistry Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. 112, 22–32. doi:10.1016/j.phytochem.2014.09.016.
- 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. doi:10.1016/j.gene.2004.12.014.
- Kaufmann, K., Muiño, J. M., Jauregui, R., Airoidi, C. A., Smaczniak, C., Krajewski, P., et al. (2009). Target genes of the MADS transcription factor *sepallata3*: Integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower. *PLoS Biol.* 7, 0854–0875. doi:10.1371/journal.pbio.1000090.
- Kazan, K., and Lyons, R. (2016). The link between flowering time and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 67, 47–60. doi:10.1093/jxb/erv441.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., et al. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set : protocols , evaluation and model data analysis of UV-B light , drought and cold stress responses. 347–363. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03052.x.
- Kinoshita, N., Wang, H., Kasahara, H., Liu, J., MacPherson, C., Machida, Y., et al. (2012). IAA-Ala Resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates *Arabidopsis* root architecture changes during high osmotic stress. *Plant Cell* 24, 3590–3602. doi:10.1105/tpc.112.097006.
- Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Sci.* 234, 155–162. doi:10.1016/j.plantsci.2015.02.012.
- Kramer, P. J. (1983a). “Drought Tolerance and Water Use Efficiency,” in *Water Relations of Plants*, 390–415. doi:10.1016/b978-0-12-425040-6.50016-3.
- Kramer, P. J. (1983b). “Root Growth and Functions,” in *Water Relations of Plants*, 120–145. doi:10.1016/B978-0-12-425040-6.50008-4.
- Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H. S., Zhu, T., Wang, X., and Harper, J. F. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* 130, 2129–2141. doi:10.1104/pp.008532.
- Kuromori, T., Seo, M., and Shinozaki, K. (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends Plant Sci.* 23, 513–522. doi:10.1016/j.tplants.2018.04.001.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Kitamura, S., Hirai, N., Kamiya, Y., et al. (2004). The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A. 23, 1647–1656. doi:10.1038/sj.emboj.7600121.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., et al. (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22, 2623–2633. doi:10.1093/emboj/cdg277.
- Kwak, J. M., Nguyen, V., and Schroeder, J. I. (2006). The role of reactive oxygen species in hormonal responses. *Plant Physiol.* 141, 323–9. doi:10.1104/pp.106.079004.
- Lachowiec, J., Shen, X., Queitsch, C., and Carlborg, Ö. (2015). A genome-wide association analysis

- reveals epistatic cancellation of additive genetic variance for root length in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 11, 1–21. doi:10.1371/journal.pgen.1005541.
- Laskowski, M. J., Dreher, K. A., Gehring, M. A., Abel, S., Gensler, A. L., and Sussex, I. M. (2002). FQR1, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiol.* 128, 578–90. doi:10.1104/pp.010581.
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., et al. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 14, 2366–2376. doi:10.1101/gad.813600.
- Lee, J., and Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *J. Exp. Bot.* 61, 2247–2254. doi:10.1093/jxb/erq098.
- 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. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03552.x.
- Leseberg, C. H., Li, A., Kang, H., Duvall, M., and Mao, L. (2006). Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. *Gene* 378, 84–94. doi:10.1016/j.gene.2006.05.022.
- Li, H., Dong, Q., Li, G., and Ran, K. (2017a). Identification and expression analysis of 11 MADS-box genes in peach (*Prunus persica* var. *nectarina* ‘Luxing’). *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 0316, 0–12. doi:10.1080/14620316.2017.1366876.
- Li, X., Chen, L., Forde, B. G., and Davies, W. J. (2017b). The Biphasic Root Growth Response to Abscisic Acid in *Arabidopsis* Involves Interaction with Ethylene and Auxin Signalling Pathways. *Front. Plant Sci.* 8, 1–12. doi:10.3389/fpls.2017.01493.
- Li, X., Liang, Y., Gao, B., Mijiti, M., Bozorov, T. A., Yang, H., et al. (2019). ScDREB10, an A-5c type of DREB gene of the desert moss *syntrichia caninervis*, confers osmotic and salt tolerances to *Arabidopsis*. *Genes (Basel)*. 10, 146. doi:10.3390/genes10020146.
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowmant, J. L., and Yanofsky, M. F. (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* 404, 766–770. doi:10.1038/35008089.
- Liszskay, A., Van Der Zalm, E., and Schopfer, P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates (O₂·, H₂O₂, and ·OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol.* 136, 3114–3123. doi:10.1104/pp.104.044784.
- Liu, C., Chen, H., Er, H. L., Soo, H. M., Kumar, P. P., Han, J. H., et al. (2008). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development* 135, 1481–1491. doi:10.1242/dev.020255.
- Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C., and Yu, H. (2009). Regulation of Floral Patterning by Flowering Time Genes. *Dev. Cell* 16, 711–722. doi:10.1016/J.DEVCEL.2009.03.011.
- Liu, H., Sultan, M. A. R. F., Liu, X. L., Zhang, J., Yu, F., and Zhao, H. X. (2015). Physiological and comparative proteomic analysis reveals different drought responses in roots and leaves of drought-tolerant wild wheat (*Triticum boeoticum*). *PLoS One* 10, 1–29. doi:10.1371/journal.pone.0121852.
- Lohmann, J. U., and Weigel, D. (2002). Building beauty: The genetic control of floral patterning. *Dev. Cell* 2, 135–142. doi:10.1016/s1534-5807(02)00122-3.
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell Environment* 28, 67–77.
- Mao, L., Begum, D., Chuang, H., Budiman, M. A., Szymkowiak, E. J., Irish, E. E., et al. (2000). is a MADS-box gene controlling tomato ower abscission zone development. *Nature* 406, 910–913.
- McGonigle, B., Bouhidel, K., and Irish, V. F. (1996). Nuclear localization of the *Arabidopsis*

- APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes Dev.* 10, 1812–1821. doi:10.1101/gad.10.14.1812.
- Melzer, R., and Theißen, G. (2009). Reconstitution of “floral quartets” in vitro involving class B and class E floral homeotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 37, 2723–2736. doi:10.1093/nar/gkp129.
- Michaels, S. D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Pelaz, S., Yanofsky, M., and Amasino, R. M. (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *Plant J.* 33, 867–874. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01671.x.
- Michel, B. E. (1983). Evaluation of the water potentials of solutions of Polyethylene Glycol 8000 both in the absence and presence of other solutes. *Plant Physiol.* 72, 66–70. doi:10.1104/pp.72.1.66.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., and Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell Environ.* 33, 453–467. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x.
- Mohun, T., Garrett, N., and Treisman, R. (1987). Xenopus cytoskeletal actin and human c-fos gene promoters share a conserved protein-binding site. *EMBO J.* 6, 667–673. doi:10.1002/j.1460-2075.1987.tb04806.x.
- Montiel, G., Gantet, P., Jay-Allemand, C., and Breton, C. (2004). Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol.* 136, 3478–3485. doi:10.1104/pp.104.051029.
- Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, C. B., Paek, N. C., et al. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 35, 613–623. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01833.x.
- Moreno-Risueno, M. A., Van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., and Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching. *Science* 329, 1306–11. doi:10.1126/science.1191937.
- Mouradov, A., Cremer, F., and Coupland, G. (2002). Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* 14, 111–131. doi:10.1105/tpc.001362.
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell Environ.* 25, 239–250. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x.
- Murasnige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tohaoco Tissue Cultures. *Physiol. Plant* 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Nam, J., Kim, J., Lee, S., An, G., Ma, H., and Nei, M. (2004). Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1910–1915. doi:10.1073/pnas.0308430100.
- Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165–185. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144046.
- Nath, R. R., Mohan Prasad, A., and Srinivasan, R. (2005). T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis: a tool for functional genomics. *Electron. J. Biotechnol.* 8, 0–0. doi:10.2225/vol8-issue1-fulltext-4.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Stewart, A. J., Jenkins, G. I., Caboche, M., et al. (2002). The transparent testa 16 locus encodes the arabidopsis bister mads domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* 14, 2463–2479. doi:10.1105/tpc.004127.
- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., and Xu, H. E. (2014). Abscisic acid perception and signaling : structural mechanisms and applications. *Nat. Publ. Gr.* 35, 567–584. doi:10.1038/aps.2014.5.
- Nikonorova, N., Van Den Broeck, L., Zhu, S., Van De Cotte, B., Dubois, M., Gevaert, K., et al.

- (2018). Early mannitol-triggered changes in the Arabidopsis leaf (phospho)proteome reveal growth regulators. *J. Exp. Bot.* 69, 4591–4607. doi:10.1093/jxb/ery261.
- Noctor, G., and Foyer, C. H. (2016). Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. *Plant Physiol.* 171, 1581–1592. doi:10.1104/pp.16.00346.
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., and Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55, 989–1003. doi:10.1016/0092-8674(88)90244-9.
- Ortega-Martínez, O., Pernas, M., Carol, R. J., and Dolan, L. (2007). Ethylene modulates stem cell division in the Arabidopsis thaliana root. *Science* 317, 507–10. doi:10.1126/science.1143409.
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., et al. (2013). Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 609–24. doi:10.1105/tpc.112.105700.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 5, 86. doi:10.3389/fpls.2014.00086.
- Pacheco-Escobedo, M. A., Ivanov, V. B., Ransom-Rodríguez, I., Arriaga-Mejía, G., Ávila, H., Baklanov, I. A., et al. (2016). Longitudinal zonation pattern in Arabidopsis root tip defined by a multiple structural change algorithm. *Ann. Bot.* 118, 763–776. doi:10.1093/aob/mcw101.
- Pacifici, E., Di Mambro, R., Dello Ioio, R., Costantino, P., and Sabatini, S. (2018). Acidic cell elongation drives cell differentiation in the Arabidopsis root. *EMBO J.* 37. doi:10.15252/embj.201899134.
- Pařenicová, L., De Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., et al. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-Box transcription factor family in Arabidopsis: New openings to the MADS world. *Plant Cell* 15, 1538–1551. doi:10.1105/tpc.011544.
- Passmore, S., Maine, G. T., Elble, R., Christ, C., and Tye, B. K. (1988). Saccharomyces cerevisiae protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT α cells. *J. Mol. Biol.* 204, 593–606. doi:10.1016/0022-2836(88)90358-0.
- Peleg, Z., and Blumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 290–295. doi:10.1016/j.pbi.2011.02.001.
- Pérez-Ruiz, R. V., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., Ugartechea-Chirino, Y., Villajuana-Bonequi, M., de Folter, S., et al. (2015). XAANTAL2 (AGL14) is an important component of the complex gene regulatory network that underlies arabidopsis shoot apical meristem transitions. *Mol. Plant* 8, 796–813. doi:10.1016/j.molp.2015.01.017.
- Puranik, S., Acajjaoui, S., Conn, S., Costa, L., Conn, V., Vial, A., et al. (2014). Structural basis for the oligomerization of the MADS domain transcription factor SEPALLATA3 in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 3603–3615. doi:10.1105/tpc.114.127910.
- Rahantaniaina, M.-S., Tuzet, A., Mhamdi, A., and Noctor, G. (2013). Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation: how is glutathione oxidized in plants? *Front. Plant Sci.* 4, 477. doi:10.3389/fpls.2013.00477.
- Rahni, R., and Birnbaum, K. D. (2019). Week-long imaging of cell divisions in the Arabidopsis root meristem. *Plant Methods* 15, 30. doi:10.1186/s13007-019-0417-9.
- Redman, J. C., Haas, B. J., Tanimoto, G., and Town, C. D. (2004). Development and evaluation of an Arabidopsis whole genome Affymetrix probe array. *Plant J.* 38, 545–561. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02061.x.
- Rellán-Álvarez, R., Lobet, G., and Dinneny, J. R. (2016). Environmental Control of Root System Biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 619–642. doi:10.1146/annurev-arplant-043015-111848.

- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C., and Conti, L. (2013). GIGANTEA Enables Drought Escape Response via Abscisic Acid-Dependent Activation of the Florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *Plant Physiol.* 162, 1706–1719. doi:10.1104/pp.113.217729.
- Riboni, M., Test, A. R., Galbiati, M., Tonelli, C., and Conti, L. (2016). ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 67, 6309–6322. doi:10.1093/jxb/erw384.
- Riechmann, J. L., and Ratcliffe, O. J. (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 423–434. doi:10.1016/S1369-5266(00)00107-2.
- Riechmann, J. L., Wang, M., and Meyerowitz, E. M. (1996). DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Res.* 24, 3134–3141. doi:10.1073/pnas.93.10.4793.
- Rohde, A., and Bhalerao, R. P. (2007). Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci.* 12, 217–223. doi:10.1016/J.TPLANTS.2007.03.012.
- Romero-Yahuítl, V. A. (2018). Caracterización de la respuesta de la raíz de diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* a condiciones de estrés osmótico. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 99p.
- Rosales, M. A., Maurel, C., and Nacry, P. (2019). Abscisic acid coordinates dose-dependent developmental and hydraulic responses of roots to water deficit. *Plant Physiol.* 180, 2198–2211. doi:10.1104/pp.18.01546.
- Rounsley, S. D. (1995). Diverse Roles for MADS Box Genes in *Arabidopsis* Development. *Plant Cell Online* 7, 1259–1269. doi:10.1105/tpc.7.8.1259.
- 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. doi:10.1105/tpc.7.8.1259.
- Rowe, J. H., Topping, J. F., Liu, J., and Lindsey, K. (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytol.* 211, 225–239. doi:10.1111/nph.13882.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 18822–18827. doi:10.1073/pnas.0605639103.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., et al. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science (80-)*. 288, 1613–1616. doi:10.1126/science.288.5471.1613.
- Sappl, P. G., Carroll, A. J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A., et al. (2009). The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J.* 58, 53–68. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03761.x.
- Sappl, P. G., Oñate-Sánchez, L., Singh, K. B., and Millar, A. H. (2004). Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol. Biol.* 54, 205–219. doi:10.1023/B:PLAN.0000028786.57439.b3.
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., et al. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446, 811–814. doi:10.1038/nature05703.
- Sarry, J.-E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., et al. (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite

- profiling analyses. *Proteomics* 6, 2180–2198. doi:10.1002/pmic.200500543.
- Scharwies, J. D., and Dinneny, J. R. (2019). Water transport, perception, and response in plants. *J. Plant Res.* 132, 311–324. doi:10.1007/s10265-019-01089-8.
- Scheres, B., Benfey, P., and Dolan, L. (2002). “Root Development,” in *The Arabidopsis Book* (American Society of Plant Biologists), e0101. doi:10.1199/tab.0101.
- Schönrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Köhler, C., Grissem, W., et al. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev.* 20, 1667–1678. doi:10.1101/gad.377206.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahy, G., and Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214, 821–828. doi:10.1007/s00425-001-0699-8.
- 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* (80-.). 250, 931–936. doi:10.1126/science.250.4983.931.
- Seo, P. J., Hong, S. Y., Ryu, J. Y., Jeong, E. Y., Kim, S. G., Baldwin, I. T., et al. (2012). Targeted inactivation of transcription factors by overexpression of their truncated forms in plants. *Plant J.* 72, 162–172. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05069.x.
- Shabala, S. N., and Lew, R. R. (2002). Turgor regulation in osmotically stressed *Arabidopsis* epidermal root cells. Direct support for the role of inorganic ion uptake as revealed by concurrent flux and cell turgor measurements. *Plant Physiol.* 129, 290–9. doi:10.1104/pp.020005.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., et al. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* 55, 2343–2351. doi:10.1093/jxb/erh276.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 217–223. doi:10.1016/S1369-5266(00)00067-4.
- Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58, 221–227. doi:10.1093/jxb/erl164.
- Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H. C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., et al. (2009). Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett.* 583, 2982–2986. doi:10.1016/j.febslet.2009.08.033.
- Sivakkumaran, S., and Hall, M. A. (1978). Effect of osmotic stress upon endogenous hormone levels in *Euphorbia lathyris* L. and *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 42, 1403–1411. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a085587.
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C., and Kaufmann, K. (2012a). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139, 3081–3098. doi:10.1242/dev.074674.
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Muiño, J. M., Blanvillain, R., Busscher, M., Busscher-Lange, J., et al. (2012b). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 1560–1565. doi:10.1073/pnas.1112871109.
- Smirnoff, N. (2007). “Preface,” in *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, ed. N. Smirnoff (Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd), xiii. doi:10.1002/9780470988565.
- Smith, J. A. C., and Griffiths, H. e. (1994). Water deficits: plant responses from cell to community. *Choice Rev. Online* 31, 3785–3785. doi:10.5860/choice.31-3785.
- Sommer, H., Beltran, J., Huijser, P., and Pape, H. (1990). Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to

transcription factors. *EMBO J.* 9, 605–613.

- Song, L., Huang, S. S. C., Wise, A., Castanoz, R., Nery, J. R., Chen, H., et al. (2016). A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science* (80-.). 354, 1550. doi:10.1126/science.aag1550.
- Sridhar, V. V., Surendrarao, A., and Liu, Z. (2006). APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development* 133, 3159–3166. doi:10.1242/dev.02498.
- Sultan, S. E. (2017). Developmental plasticity: Re-conceiving the genotype. *Interface Focus* 7. doi:10.1098/rsfs.2017.0009.
- Suzuki, M., Shinozuka, N., Hirakata, T., Nakata, M. T., Demura, T., Tsukaya, H., et al. (2018). Oligocellulase1/high expression of osmotically responsive genes15 promotes cell proliferation with histone deacetylase9 and powerdres during leaf development in arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* 9. doi:10.3389/fpls.2018.00580.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., and Murphy, A. S. (2015). *Plant physiology and development*. Sinauer Associates Available at: Sinauer Associates.
- Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V., Kim, S. H., et al. (2008). An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146, 1182–1192. doi:10.1104/pp.107.108647.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* 408, 796–815. doi:10.1038/35048692.
- Theißen, G., and Gramzow, L. (2016). “Structure and Evolution of Plant MADS Domain Transcription Factors,” in *Plant Transcription Factors* (Elsevier Inc.), 127–138. doi:10.1016/B978-0-12-800854-6/00008-7.
- Theißen, G., Kim, J. T., and Saedler, H. (1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43, 484–516. doi:10.1007/BF02337521.
- Theißen, G., Melzer, R., and Rümpler, F. (2016). MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *Development* 143, 3259–3271. doi:10.1242/dev.134080.
- Theißen, G., Rümpler, F., and Gramzow, L. (2018). Array of MADS-Box Genes: Facilitator for Rapid Adaptation? *Trends Plant Sci.* 23, 563–576. doi:10.1016/j.tplants.2018.04.008.
- Thieme, C. J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L., et al. (2015). Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat. Plants* 1, 15025. doi:10.1038/nplants.2015.25.
- Thole, J. M., Beisner, E. R., Liu, J., Venkova, S. V., and Strader, L. C. (2014). Abscisic acid regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in Arabidopsis thaliana. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 4, 1259–1274. doi:10.1534/g3.114.011080.
- Tsukagoshi, H. (2016). Control of root growth and development by reactive oxygen species. *Curr. Opin. Plant Biol.* 29, 57–63. doi:10.1016/J.PBI.2015.10.012.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143, 606–616. doi:10.1016/j.cell.2010.10.020.
- Turner, N. C., and Begg, J. E. (1981). Plant-water relations and adaptation to stress. *Plant Soil* 58, 97–131. doi:10.1007/BF02180051.
- Ubeda-Tomás, S., Beemster, G. T. S., and Bennett, M. J. (2012). Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour. *Trends Plant Sci.* 17, 326–331.

doi:10.1016/j.tplants.2012.02.002.

- Ubeda-Tomás, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G. T. S., Bhalerao, R., Swarup, R., et al. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Curr. Biol.* 19, 1194–1199. doi:10.1016/j.cub.2009.06.023.
- Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordana, X., and Holuigue, L. (2004). NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 34–42. doi:10.1094/MPMI.2004.17.1.34.
- Van den Broeck, L., Dubois, M., Vermeersch, M., Storme, V., Matsui, M., and Inzé, D. (2017). From network to phenotype: the dynamic wiring of an Arabidopsis transcriptional network induced by osmotic stress. *Mol. Syst. Biol.* 13, 961. doi:10.15252/msb.20177840.
- van der Weele, C. M., Spollen, W. G., Sharp, R. E., and Baskin, T. I. (2000). Growth of Arabidopsis thaliana seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J. Exp. Bot.* 51, 1555–1562. doi:10.1093/jexbot/51.350.1555.
- Verbelen, J.-P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluska, F. (2006). The root apex of Arabidopsis thaliana consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone. *Plant Signal. Behav.* 1, 296–304. doi:10.4161/psb.1.6.3511.
- Verelst, W., Twell, D., de Folter, S., Immink, R., Saedler, H., and Münster, T. (2007). MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biol.* 8, 1–15. doi:10.1186/gb-2007-8-11-r249.
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45, 523–539. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., et al. (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *ripening-inhibitor (rin)* locus. *Science (80-)*. 296, 343–346. doi:10.1126/science.1068181.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., and Mauch, F. (2002). Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* 49, 515–532. doi:10.1023/A:1015557300450.
- Wang, M., Le Moigne, M. A., Bertheloot, J., Crespel, L., Perez-Garcia, M. D., Ogé, L., et al. (2019). BRANCHED1: A key hub of shoot branching. *Front. Plant Sci.* 10, 76. doi:10.3389/fpls.2019.00076.
- Wang, Y. G., Fu, F. L., Yu, H. Q., Hu, T., Zhang, Y. Y., Tao, Y., et al. (2018a). Interaction network of core ABA signaling components in maize. *Plant Mol. Biol.* 96, 245–263. doi:10.1007/s11103-017-0692-7.
- Wang, Z., Wang, F., Hong, Y., Yao, J., Ren, Z., Shi, H., et al. (2018b). The flowering repressor SVP confers drought resistance in Arabidopsis by regulating abscisic acid catabolism. *Mol. Plant* 11, 1184–1197. doi:10.1016/j.molp.2018.06.009.
- Wang, Z. Y., Gehring, C., Zhu, J., Li, F. M., Zhu, J. K., and Xiong, L. (2015). The arabidopsis vacuolar sorting receptor1 is required for osmotic stress-induced abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 167, 137–152. doi:10.1104/pp.114.249268.
- Wei, M., Wang, Y., Pan, R., and Li, W. (2018). Genome-wide identification and characterization of MADS-box family genes related to floral organ development and stress resistance in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. *Forests* 9, 1–21. doi:10.3390/f9060304.
- West, G., Inze, D., Inzé, D., Beemster, G., and Inze, D. (2004). Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. *Plant Physiol.* 135, 1050–1058. doi:10.1104/pp.104.040022.termining.

- Wilson, Z. A. (2000). *ARABIDOPSIS: a practical approach*. OXFORD UNIV Press UK.
- Wrzaczek, M., Brosché, M., and Kangasjärvi, J. (2013). ROS signaling loops — production, perception, regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 575–582. doi:10.1016/J.PBI.2013.07.002.
- Xing, L., Zhao, Y., Gao, J., Xiang, C., and Zhu, J.-K. (2016). The ABA receptor PYL9 together with PYL8 plays an important role in regulating lateral root growth. *Sci. Rep.* 6, 27177. doi:10.1038/srep27177.
- Xing, S., Lauri, A., and Zachgo, S. (2006). Redox regulation and flower development: A novel function for glutaredoxins. *Plant Biol.* 8, 547–555. doi:10.1055/s-2006-924278.
- Xiong, L., Schumaker, K. S. S., and Zhu, J. K. K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14, 165. doi:10.1105/tpc.000596.S166.
- Xu, W., Jia, L., Shi, W., Liang, J., Zhou, F., Li, Q., et al. (2013). Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytol.* 197, 139–150. doi:10.1111/nph.12004.
- Yamada, K., Nagano, A. J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2008). NAI2 is an endoplasmic reticulum body component that enables ER body formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20, 2529–2540. doi:10.1105/tpc.108.059345.
- Yamada, K., Nagano, A. J., Ogasawara, K., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M. (2009). The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific β -glucosidases. *Plant Signal. Behav.* 4, 849–852. doi:10.4161/psb.4.9.9377.
- Yamaguchi, M., and Sharp, R. E. (2010). Complexity and coordination of root growth at low water potentials: Recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant, Cell Environ.* 33, 590–603. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.02064.x.
- Yang, L., Zhang, J., He, J., Qin, Y., Hua, D., Duan, Y., et al. (2014). ABA-Mediated ROS in Mitochondria Regulate Root Meristem Activity by Controlling PLETHORA Expression in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004791.
- Yang, Y., Costa, A., Leonhardt, N., Siegel, R. S., and Schroeder, J. I. (2008). Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. *Plant Methods* 4, 6. doi:10.1186/1746-4811-4-6.
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., and Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346, 35–39. doi:10.1038/346035a0.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., et al. (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell Environ.* 38, 35–49. doi:10.1111/pce.12351.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., et al. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J.* 61, 672–685. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x.
- Yoshida, T., Mogami, J., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 133–139. doi:10.1016/j.pbi.2014.07.009.
- Yu, C., Su, S., Xu, Y., Zhao, Y., Yan, A., Huang, L., et al. (2014a). The effects of fluctuations in the nutrient supply on the expression of five members of the AGL17 clade of MADS-box genes in rice. *PLoS One* 9, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0105597.
- Yu, H., Xu, Y., Tan, E. L., and Kumar, P. P. (2002). AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16336–16341.

doi:10.1073/pnas.212624599.

- Yu, L. H., Miao, Z. Q., Qi, G. F., Wu, J., Cai, X. T., Mao, J. L., et al. (2014b). MADS-Box transcription factor AGL21 regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. *Mol. Plant* 7, 1653–1669. doi:10.1093/mp/ssu088.
- Zahn, L. M., Feng, B., and Ma, H. (2006). Beyond the ABC-Model: Regulation of Floral Homeotic Genes. *Adv. Bot. Res.* 44, 163–207. doi:10.1016/S0065-2296(06)44004-0.
- Zhang, H., and Forde, B. G. (1998). An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* (80-.). 279, 407–409. doi:10.1126/science.279.5349.407.
- Zhang, H., Han, W., De Smet, I., Talboys, P., Loya, R., Hassan, A., et al. (2010). ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *Plant J.* 64, 764–774. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04367.x.
- Zhao, S., Luo, Y., Zhang, Z., Xu, M., Wang, W., Zhao, Y., et al. (2014). ZmSOC1, an MADS-box transcription factor from *Zea mays*, promotes flowering in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 19987–20003. doi:10.3390/ijms151119987.
- Zhebentyayeva, T. N., Fan, S., Chandra, A., Bielenberg, D. G., Reighard, G. L., Okie, W. R., et al. (2014). Dissection of chilling requirement and bloom date QTLs in peach using a whole genome sequencing of sibling trees from an F2 mapping population. *Tree Genet. Genomes* 10, 35–51. doi:10.1007/s11295-013-0660-6.
- Zhu, J. K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* 167, 313–324. doi:10.1016/j.cell.2016.08.029.
- Zhu, Q., Zhang, J., Gao, X., Tong, J., Xiao, L., Li, W., et al. (2010). The Arabidopsis AP2/ERF transcription factor RAP2.6 participates in ABA, salt and osmotic stress responses. *Gene* 457, 1–12. doi:10.1016/j.gene.2010.02.011.
- Zhu, S. Y., Yu, X. C., Wang, X. J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R. C., et al. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 3019–3036. doi:10.1105/tpc.107.050666.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 136, 2621–2632. doi:10.1104/pp.104.046367.

ANEXO

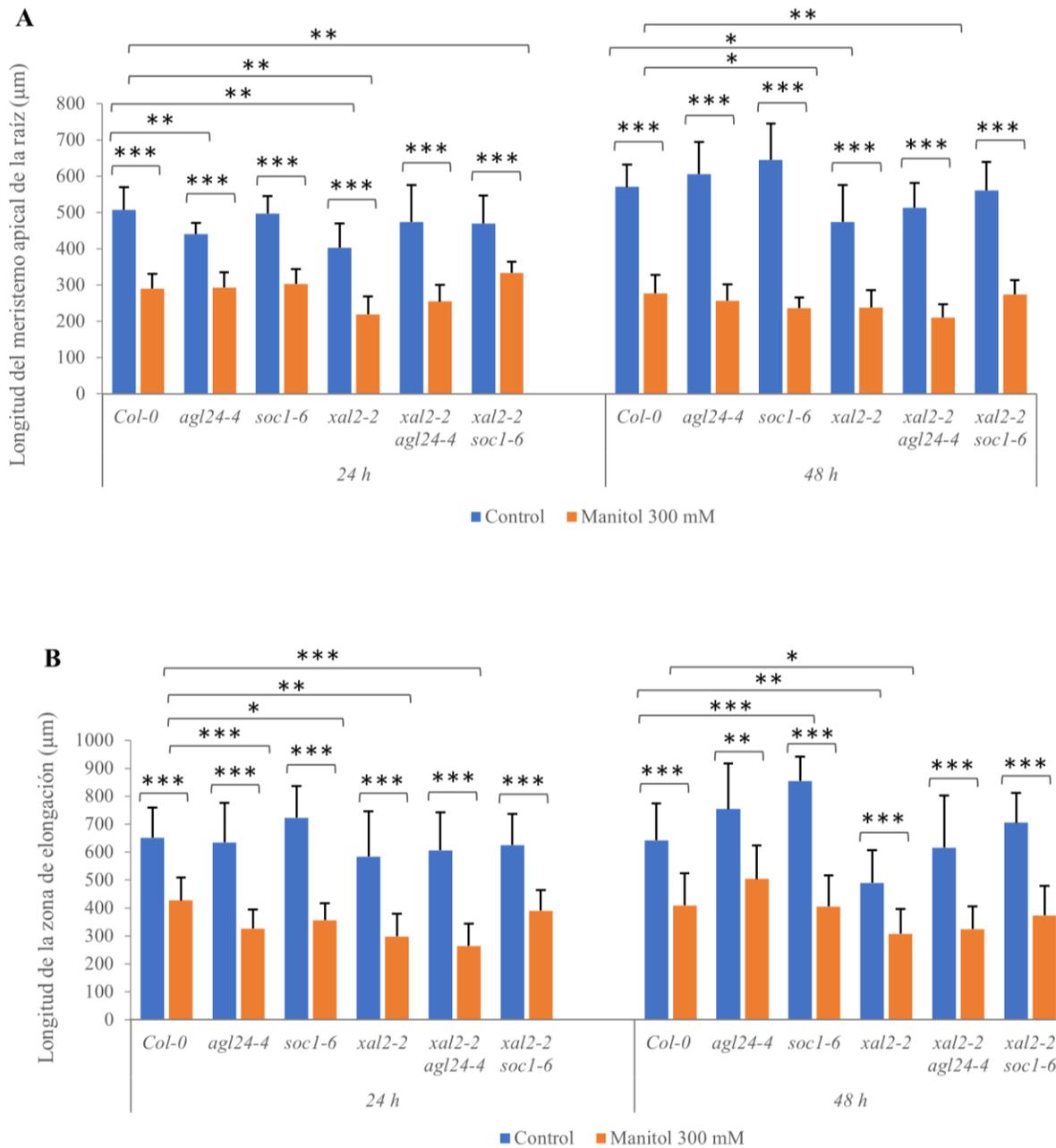


Figura A 1. A) Longitud del meristemo apical de la raíz primaria (RAM). B) Longitud de la zona de elongación. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps a medio MS (0.2X) sin manitol o suplementado con manitol 300 mM, para su crecimiento durante 24 o 48 h. Los datos son la media \pm DE ($n = 10$). Se presentan las comparaciones pareadas de los genotipos mutantes contra Col-0 (plantas silvestres), y del tratamiento de manitol 300 mM contra el tratamiento control, en la prueba de t de Student: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

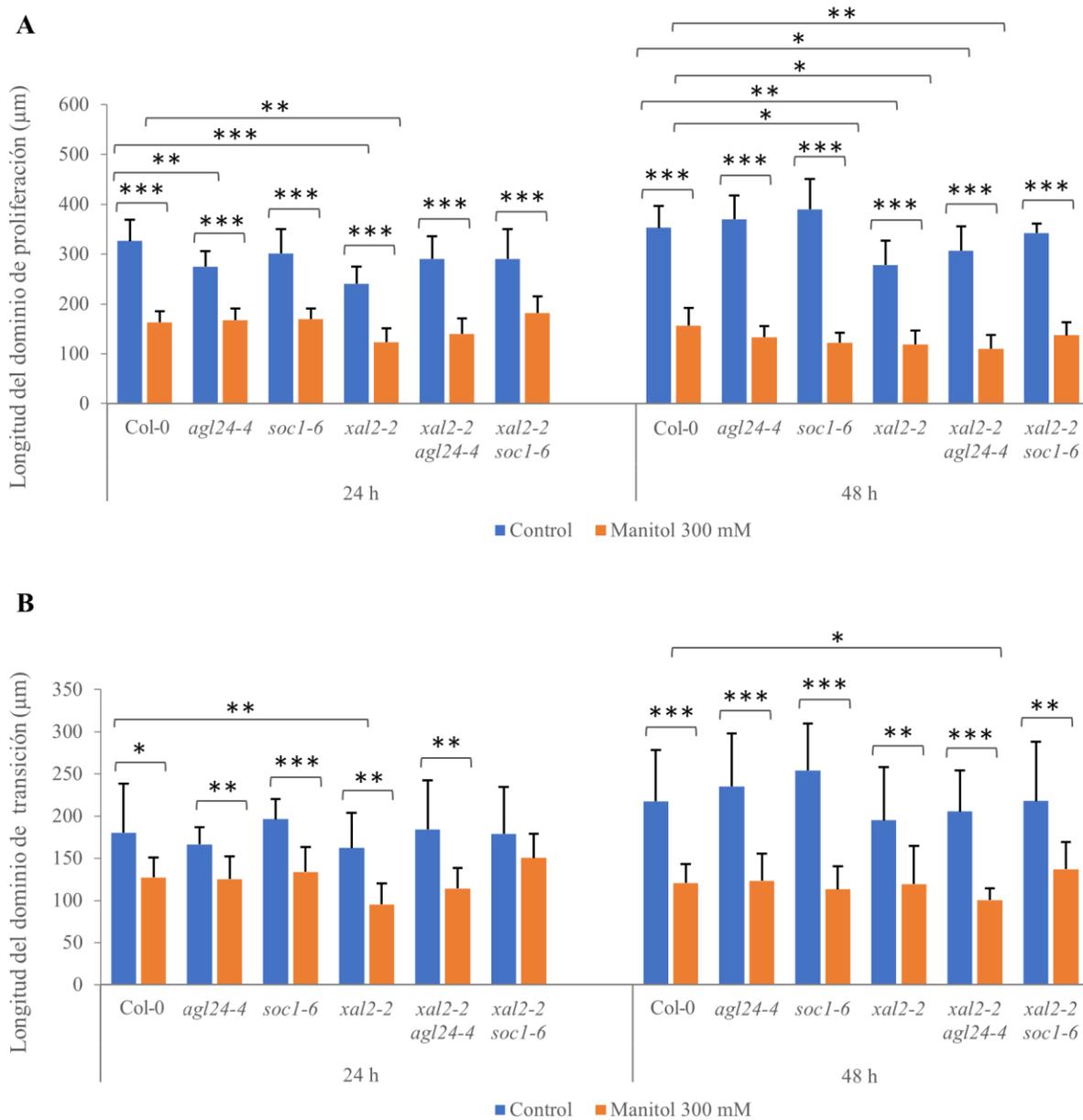


Figura A 2. A) Longitud del dominio de proliferación. B) Longitud del dominio de transición. Las plántulas cultivadas en medio MS (0.2X) fueron transferidas a los 5 dps a medio MS (0.2X) sin manitol o suplementado con manitol 300 mM, para su crecimiento durante 24 o 48 h. Los datos son la media \pm DE ($n = 10$). Se presentan las comparaciones pareadas de los genotipos mutantes contra Col-0 (plantas silvestres), y del tratamiento de manitol 300 mM contra el tratamiento control, en la prueba de t de Student: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

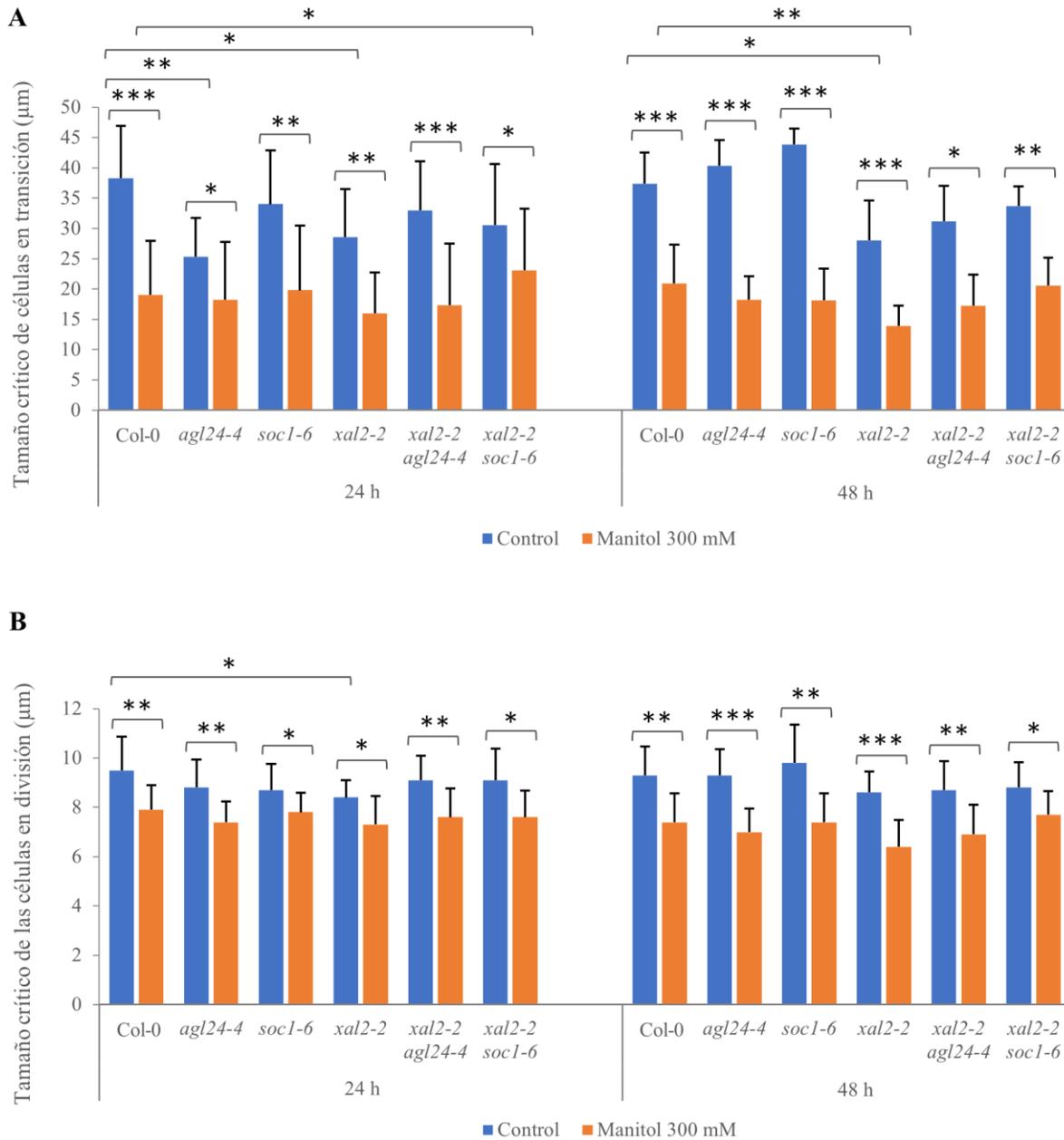


Figura A 3. A) Tamaño crítico de las células que transitan del dominio de proliferación al dominio de transición. B) Tamaño crítico de las células que transitan del dominio de transición a la zona de elongación. Las plántulas se cultivaron en medio MS (0.2X) y a los 5 dps se transfirieron a medio MS (0.2X) sin manitol (Control) o suplementado con manitol 300 mM, para su crecimiento durante 24 o 48 h. Los datos son la media \pm DE ($n = 10$). Se presenta el análisis comparativo de genotipos mutantes versus Col-0 (plantas silvestres), en la prueba t de Student: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

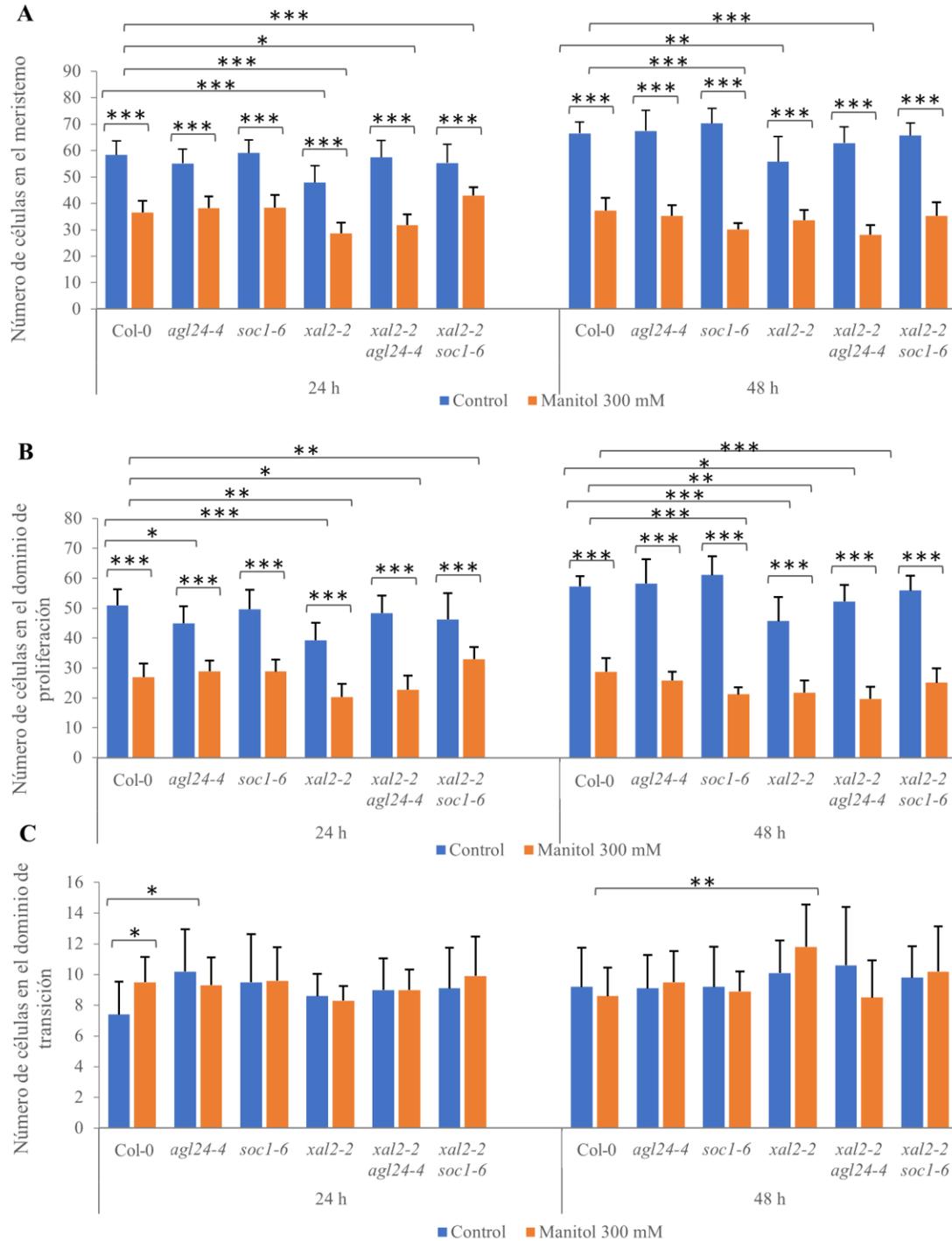


Figura A 4. A) Número de células en el meristemo apical de la raíz primaria. B) Número de células en el dominio de proliferación. C) Número de células en el dominio de transición. Las plántulas se cultivaron en medio MS (0.2X) y a los 5 dps se transfirieron a medio MS (0.2X) sin manitol (Control) o suplementado con manitol 300 mM, para su crecimiento durante 24 o 48 h. Los datos son la media \pm DE ($n = 10$). Se presenta el análisis comparativo de genotipos mutantes versus Col-0 (plantas silvestres), en la prueba t de Student: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.



MADS-Box Genes Are Key Components of Genetic Regulatory Networks Involved in Abiotic Stress and Plastic Developmental Responses in Plants

Natalia Castelán-Muñoz^{1,2†}, Joel Herrera^{1,3†}, Wendy Cajero-Sánchez¹, Maite Arrizubieta¹, Carlos Trejo⁴, Berenice García-Ponce¹, María de la Paz Sánchez¹, Elena R. Álvarez-Buylla^{1,3} and Adriana Garay-Arroyo^{1,3*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Annette Becker,
University of Giessen, Germany

Reviewed by:

Konstantin Skryabin,
Russian Academy of Sciences (RAS),
Russia
Rainer Melzer,
University College Dublin, Ireland

*Correspondence:

Adriana Garay-Arroyo
agaray@iecologia.unam.mx

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Development and EvoDevo,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 24 March 2019

Accepted: 13 June 2019

Published: 10 July 2019

Citation:

Castelán-Muñoz N, Herrera J,
Cajero-Sánchez W, Arrizubieta M,
Trejo C, García-Ponce B,
Sánchez MdP, Álvarez-Buylla ER and
Garay-Arroyo A (2019) MADS-Box
Genes Are Key Components of
Genetic Regulatory Networks Involved
in Abiotic Stress and Plastic
Developmental Responses in Plants.
Front. Plant Sci. 10:853.
doi: 10.3389/fpls.2019.00853

¹Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética y Desarrollo de Plantas, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ²Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Mexico, ³Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁴Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Mexico

Plants, as sessile organisms, adapt to different stressful conditions, such as drought, salinity, extreme temperatures, and nutrient deficiency, via plastic developmental and growth responses. Depending on the intensity and the developmental phase in which it is imposed, a stress condition may lead to a broad range of responses at the morphological, physiological, biochemical, and molecular levels. Transcription factors are key components of regulatory networks that integrate environmental cues and concert responses at the cellular level, including those that imply a stressful condition. Despite the fact that several studies have started to identify various members of the MADS-box gene family as important molecular components involved in different types of stress responses, we still lack an integrated view of their role in these processes. In this review, we analyze the function and regulation of MADS-box gene family members in response to drought, salt, cold, heat, and oxidative stress conditions in different developmental processes of several plants. In addition, we suggest that MADS-box genes are key components of gene regulatory networks involved in plant responses to stress and plant developmental plasticity in response to seasonal changes in environmental conditions.

Keywords: MADS-box genes, abiotic stress, development, growth, flowering

1. INTRODUCTION

Plants face seasonal fluctuations and stressful environmental conditions, involving alterations in light quality and regimes (e.g., short or long days), precipitation, nutrient availability, temperature, drought, flooding, salinity, and UV exposure, among others. Stressful conditions affect multiple metabolic pathways that, in turn, can induce and integrate different intrinsic responses affecting developmental and plant morphogenetic responses. These responses allow plants to survive and adapt to a plethora of environments.

Plant development and their responses to natural changing environments and stressful conditions are often regulated by complex regulatory networks that include various types of molecular components, such as transcription factors (TFs), regulatory RNAs, and enzymes (Fujita et al., 2011; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Janiak et al., 2016; Wils and Kaufmann, 2017; Cho, 2018; Gruszka, 2018; Sarvepalli et al., 2019). In the context of regulatory networks, TFs are particularly relevant because they regulate the expression of multiple target genes and their loss or gain of function may lead to dramatic phenotypic alterations or modified plastic responses to environmental changes (Goto and Meyerowitz, 1994; Jack et al., 1994; Kramer et al., 1998; Honma and Goto, 2001; Ditta et al., 2004; Sakuma et al., 2006; Hernández-Hernández et al., 2007; Nelson et al., 2007; Welch et al., 2007).

MADS-domain TFs are key members of regulatory networks underlying multiple developmental pathways in plants, animals, and fungi (Goto and Meyerowitz, 1994; Jack et al., 1994; Honma and Goto, 2001; Pelaz et al., 2001; Messenguy and Dubois, 2003; Nadal et al., 2003; Tapia-Lopez et al., 2008; Garay-Arroyo et al., 2013; Cao et al., 2016; Thangavel and Nayar, 2018). The MADS acronym was formed by the initials of the first four MADS-domain proteins discovered: M for MINICHROMOSOME MAINTENANCE FACTOR 1 from *Saccharomyces cerevisiae*, A for AGAMOUS (AG) from *Arabidopsis thaliana* (from now on, *Arabidopsis*), D for DEFICIENS from *Antirrhinum majus*, and S for Serum Response Factor (SRF) from *Homo sapiens* (Norman et al., 1988; Passmore et al., 1988; Jarvis et al., 1989; Schwarz-Sommer et al., 1990; Sommer et al., 1990; Yanofsky et al., 1990). The function of MADS-domain proteins has been widely studied in different organisms; these proteins participate in different developmental processes in plants (Smaczniak et al., 2012a), in neural signal transmission, muscle development, and tumor occurrence in humans (Cao et al., 2016), and in osmotic stress response and cell survival in the stationary phase in yeast (Nadal et al., 2003).

A gene duplication gave rise to two MADS-domain protein lineages before the divergence of plants and animals; these lineages are easy to identify due to a strong conservation of the MADS and other protein domains: The Type I or SRF-like genes and Type II or MEF2-like genes (*MYOCYTE ENHANCER FACTOR 2*) (Alvarez-Buylla et al., 2000; Becker and Theissen, 2003). The Type II lineage, also called MIKC-type in plants, has been subdivided into MICK^c and MICK^{*} groups. Furthermore, MICK^c contains 13 different gene subfamilies or clades based on phylogenetic studies (Theissen et al., 1996; Becker and Theissen, 2003; Parenicová et al., 2003). During land plant evolution, the number and functional diversity of MADS-box genes increased due to multiple gene and genome duplications, reaching 108 members (see Table S3 from Parenicová et al., 2003) in *Arabidopsis* (Becker and Theissen, 2003; Parenicová et al., 2003; Kaufmann et al., 2005; Gramzow et al., 2010; Fan et al., 2013). Thus, MADS-box genes are widely distributed in a taxonomically broad range of monocot and dicot plant species (Table S1). It has been proposed that changes in MADS-box gene structure, expression, and function have been a major cause for

innovations in development during land plant evolution (Theissen et al., 1996; Zahn et al., 2006).

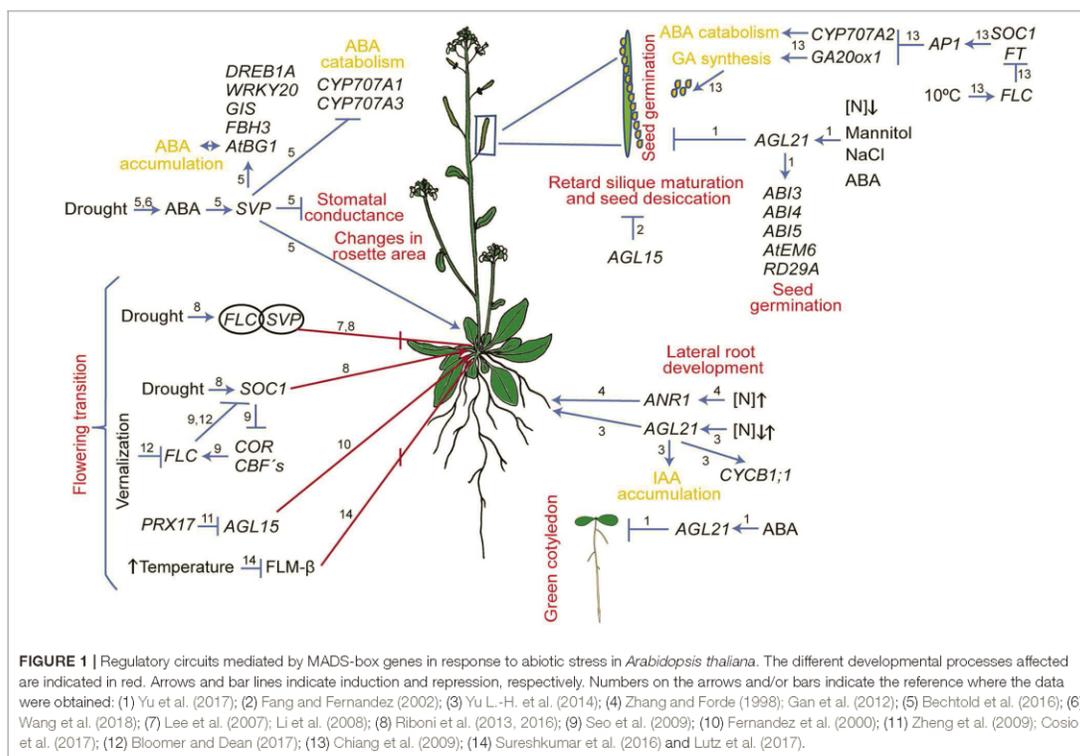
MADS-domain proteins are able to bind DNA as homo or heterodimers together with other MADS-domain proteins or with other proteins as part of different protein complexes (Schwarz-Sommer et al., 1992; Goto and Meyerowitz, 1994; Davies et al., 1996; Huang et al., 1996; Mizukami et al., 1996; Riechmann et al., 1996; Egea-Cortines et al., 1999; Pelaz et al., 2000; Honma and Goto, 2001; Sridhar et al., 2006; Tröbner et al., 2018) and function as tetramers in order to regulate transcription of their target genes (Pelaz et al., 2000; Honma and Goto, 2001; Theissen and Saedler, 2001; Sridhar et al., 2006; Brambilla et al., 2007; Immink et al., 2009; Melzer and Theissen, 2009; Smaczniak et al., 2012b). MADS-domain protein interactions, either with members of the same family or with other proteins, could explain their specificity and their ability to orchestrate different developmental programs that respond to external and internal signals such as hormones (Sridhar et al., 2006; Brambilla et al., 2007; Verelst et al., 2007; Hill et al., 2008; Liu et al., 2009; Kaufmann et al., 2010; Smaczniak et al., 2012b; Han et al., 2016). Besides, MADS-domain proteins have thousands of target genes, as shown in different studies (Kaufmann et al., 2009, 2010; Zheng et al., 2009; Deng et al., 2011; Schlesinger et al., 2011; Sullivan et al., 2011). Finally, it is of great interest to understand the MADS-domain proteins' interactome along the diverse developmental pathways they are involved in, and how these interactions could modify gene regulation and, thus, morphogenesis (Sablowski, 2010).

In *Arabidopsis*, MADS-box genes participate in diverse developmental processes such as meristem specification, flowering transition, seed, root and flower development, and fruit ripening (Smaczniak et al., 2012a). Their function in flower development has been deeply studied and summarized in many excellent reviews (Smaczniak et al., 2012a; Yan et al., 2016; Bartlett, 2017; Bloomer and Dean, 2017; Whittaker and Dean, 2017; Callens et al., 2018; Theissen et al., 2018). Moreover, several MADS-box genes have been implied in plant responses to different abiotic stress conditions using both genomic and functional genetic approaches (Table S1), but we are lacking an integrative view of these studies.

The aim of this review is to integrate and analyze the available information regarding the participation of MADS-domain proteins in regulatory networks involved in abiotic stress and developmental plastic responses, primarily in *Arabidopsis* (see Figures 1, 2), but also in other plant species (see Figures 2A–C, 3).

2. MADS-DOMAIN TRANSCRIPTION FACTORS' ROLE IN DEVELOPMENTAL PLASTICITY RESPONSES TO STRESSFUL CONDITIONS

Plant development is highly plastic, allowing plants to survive and adapt to different environments (Ludlow, 1980; Zhu, 2016). Stressful conditions may trigger multiple endogenous signaling pathways that, in turn, can induce an adjustment

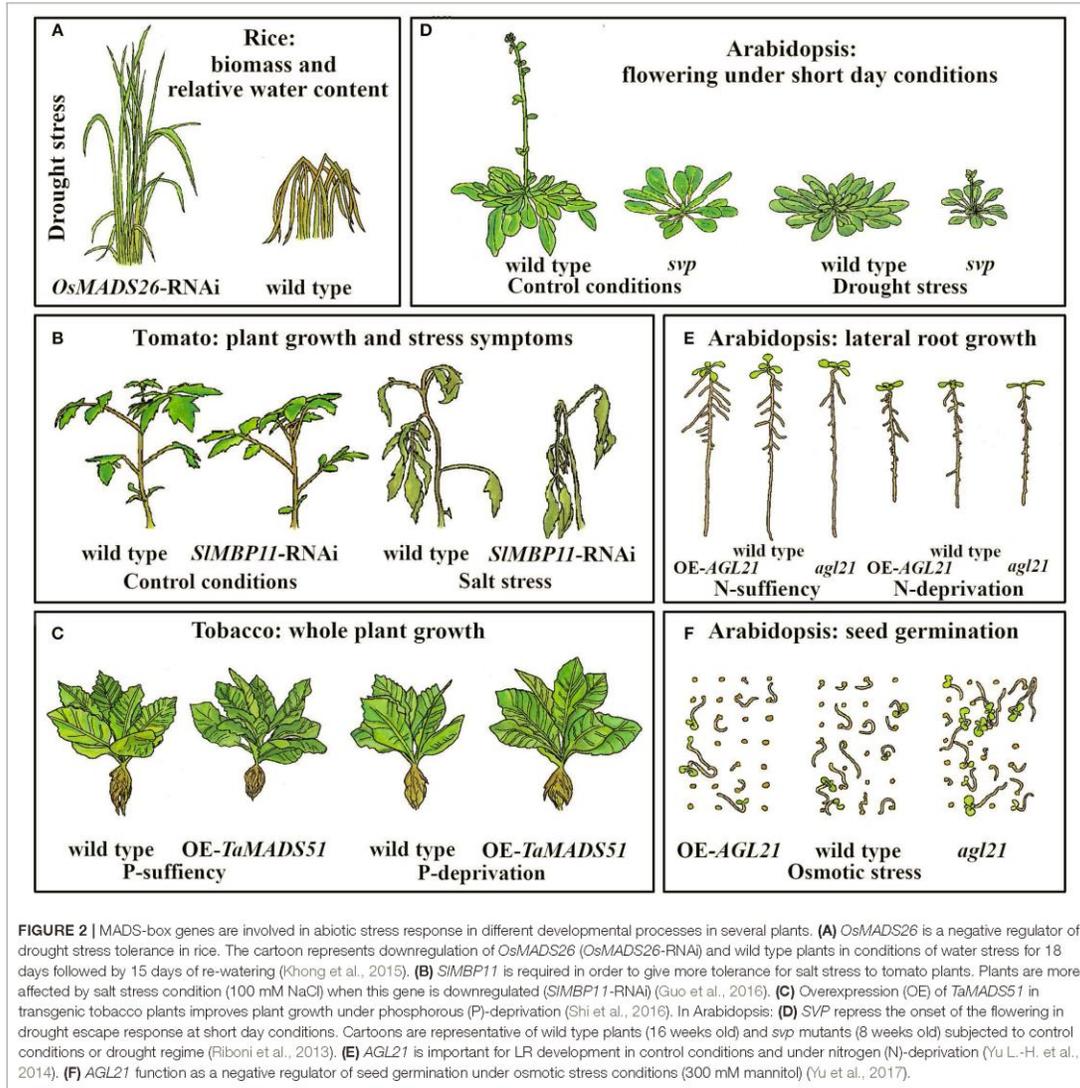


of metabolic and morphogenetic processes. Among the abiotic stress factors that greatly affect plant development in a stage-specific manner, from seed germination to reproduction, are drought, high salinity, low or high temperatures, and nutritional deficiencies (Levitt, 1985; Manavalan et al., 2009; Jogajah et al., 2013; Osakabe et al., 2014; Zhu, 2016). During abiotic stress conditions such as drought or heat, the reactive oxygen species (ROS) concentration can be augmented dramatically and surpass the cell's antioxidant system, thus generating oxidative stress (Choudhury et al., 2017). To cope with oxidative stress, cells have developed multiple antioxidant molecules that can be classified as enzymatic or non-enzymatic according to their nature (Birben et al., 2012). The former includes many enzymes that catalyze the reduction of ROS such as catalase, peroxidase, superoxide dismutase, peroxiredoxin, and glutaredoxins that use glutathione as a cofactor (Mittler et al., 2004). Non-enzymatic ROS detoxification molecules include multiple reducing agents like flavonoids, carotenoids, and glutathione; these compounds reduce ROS and prevent them from oxidizing other cellular components (Maurino and Flügge, 2008). In this section, we will review how MADS-domain TFs participate in abiotic stress responses during vegetative growth, flowering, and root and seed development.

2.1. Development of Vegetative Organs Under Stress Conditions

Drought is one of the major factors that negatively affects plant growth and survival and plants have developed different adaptations to withstand water limitation (Boyer, 1982; Davies and Zhang, 1991; Comstock, 2002; Chaves and Oliveira, 2004). Water stress can be induced not only by drought but also by cold and high salinity conditions since they reduce the water potential, generating low water availability. Additionally, the phytohormone abscisic acid (ABA) is critical to withstanding stress and integrating stress signals. Therefore, plants are constantly regulating their ABA content in response to different external and internal conditions (Vishwakarma et al., 2017; Jurkiewicz and Batoko, 2018). Drought, cold, and high salinity induce common response mechanisms that include ABA-dependent and ABA-independent signaling transduction pathways (Bartels and Sunkar, 2005; Yoshida et al., 2014a).

Rice (*Oryza sativa*) is one of the most important crops in the world and its plantations are especially susceptible to drought conditions. It has been reported that several MADS-box genes are differentially expressed during drought stress in rice (Table S1). For example, the expression of *OsMADS26*, the rice *AGL12* ortholog, is enhanced by mannitol, a compound that induces osmotic stress by mimicking drought stress conditions (Lee et al.,



2008). *OsMADS26* acts as a regulator of stress-related responses such as drought or pathogen infections (Khong et al., 2015). Interestingly, overexpression (OE) of this gene, either in rice or in Arabidopsis plants grown under control conditions, causes a severe stress phenotype that kills most plants. The majority of the survivors, show reduced root/shoot growth, sterility, root curling, and a pale green coloration (Lee et al., 2008). Accordingly, *OsMADS26-GR* lines induced with different concentrations of dexamethasone show curly leaves, short shoots and roots, and roots with a purple pigmentation. The phenotypes observed in

the OE lines (either constitutive or inducible) correlated with those observed in plants exposed to stressful conditions (Lee et al., 2008). In contrast, Khong et al. (2015) did not observe any severe phenotypic alteration in *OsMADS26* OE plants grown under control conditions.

Moreover, Lee et al. (2008) reported that *OsMADS26* loss of function and wild type plants exhibited similar behaviors under stress conditions. However, Khong et al. (2015) found that, under water deficit, loss of function lines of *OsMADS26* (*OsMADS26*-RNAi) showed higher biomass and

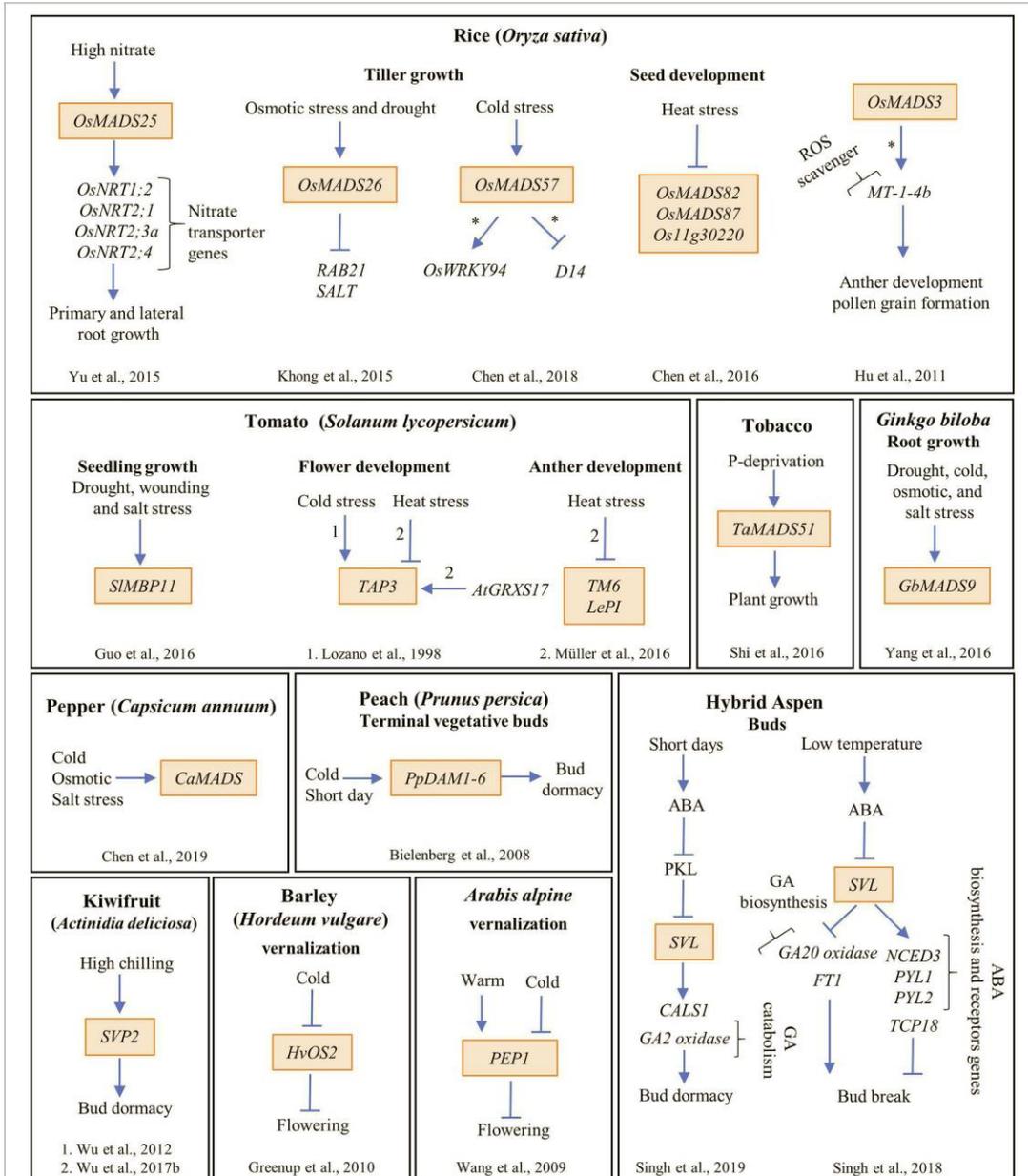


FIGURE 3 | The MADS-box genes participate in diverse genetic interactions that integrate the environmental signals to several development processes in different plant species. The MADS-box genes are highlighted in orange boxes; arrows and bar lines indicate induction and repression, respectively; asterisk (*) means direct regulation; and the numbers on the arrows indicate the reference where the data were obtained.

yield, increased plant capacity to maintain both chlorophyll a and b content and leaf relative water content (RWC), and improved recovery potential after re-watering, compared to wild type plants (Figure 2A). In addition, Lee et al. (2008) reported that OsMADS26 positively regulates many genes involved in stress-related processes, especially genes that participate in ROS homeostasis such as NADPH-oxidase, peroxidase, and oxidoreductases. Nevertheless, these results have little overlap with those from Khong et al. (2015), who found that OsMADS26 negatively regulates drought, salt, and ROS responsive genes such as *RESPONSIVE TO ABA21*, encoding a rice dehydrin, *SALT STRESS-INDUCED PROTEIN* and the ROS scavenging enzyme Peroxidase 22 (Figure 3).

Discrepancies between these two groups' results may be explained either by disparities in the expression levels of OsMADS26: no expression in the knockout mutant (Lee et al., 2008) vs low expression in the OsMADS26-RNAi line (Khong et al., 2015), or by the different genetic backgrounds employed in the studies. Despite this, it seems clear that OsMADS26 plays a fundamental role as a stress-signal integrator and that systemic approaches are still needed to unravel the participation of OsMADS26 in the regulatory network underlying water stress responses.

Other studies made in rice determined that OsMADS57, one of the five MADS-domain proteins belonging to the AGL17 clade, functions as a promoter of tolerance to cold stress (Arora et al., 2007). The gene is induced by salt, drought, abscisic acid, and chilling. In addition, it was shown that the OE line had a higher survival rate when exposed to chilling temperatures (4°C) than wild type plants, and the opposite was true for the loss of function line. Moreover, OsMADS57 directly represses the expression of *Dwarf14*, a gene involved in axillary bud development, while it directly activates the expression of *OsWRKY94*, which participates in several stress responses and various plant developmental processes. Interestingly, both binding and activation of *OsWRKY94* by OsMADS57 were shown to be temperature-dependent, suggesting that OsMADS57 may function as an on-off switch to change from transcriptional repression at normal temperatures to activation at chilling temperatures (Figure 3; Chen et al., 2018).

In Arabidopsis, the MADS-domain TF SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) provokes modifications in some developmental processes and gas exchange function in response to progressive drought stress (Figure 1; Bechtold et al., 2016). In addition, despite a significant reduction in stomatal conductance under well-watered conditions and drought stress, *svp* loss of function mutants exhibit elevated water loss and maintain substantial photosynthetic CO₂ assimilation rate throughout the drying period due to persistent rosette growth in comparison to wild type plants (Bechtold et al., 2016; see Figure 2D). Furthermore, it was shown that SVP regulates the expression of eight TFs that respond to drought; two of these, *DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A* and *FLOWERING BHLH 3*, are particularly interesting because they are involved in early responses to drought and osmotic stress, such as stomatal opening regulation (Kasuga et al., 2004; Yoshida et al., 2014b; Bechtold et al., 2016).

In addition, it was also reported that SVP is induced by drought stress and functions as a positive regulator of drought resistance via ABA homeostasis. Wang et al. (2018) showed that SVP loss of function mutants are sensitive to drought stress conditions, while the OE lines are tolerant. Moreover, SVP affects genes involved in ABA function as it directly downregulates the expression of *CYP707A1* and *CYP707A3*, the ABA 8-hydroxylase genes that participate in ABA catabolism in Arabidopsis leaves. SVP also upregulates *AtBG1*, a β -glucosidase gene involved in the hydrolysis of ABA-glucose ester (ABA-GE) into ABA, an important step for the accumulation of active ABA. All these data suggest that SVP is an important component of a regulatory network involved in drought responses (Figure 1; Riboni et al., 2013; Bechtold et al., 2016).

In tomato (*Solanum lycopersicum*), the expression of *SIMBP11* (an *AGL15* ortholog) is induced by salt stress, dehydration, and wounding (Figures 2B, 3). Knockdown lines of this gene (*SIMBP11*-RNAi) are more sensitive to salt stress conditions (100 mM NaCl) than wild type plants (Figure 2B), showing reduced fresh weight as well as reduced root growth in both post-germination and 5-week-old seedlings. Moreover, these plants also showed lower RWC and chlorophyll content, alterations associated with sensitivity to salt stress (Guo et al., 2016). Additionally, several parameters related to oxidative damage such as relative electrolyte leakage and malondialdehyde content are higher in the *SIMBP11*-RNAi plants, suggesting that this line is having an oxidative damage. Contrary to what happened with the loss of function mutant of *SIMBP11* in 5-week-old seedlings, the OE of this MADS-box gene confers tolerance to salt stress, has a higher RWC, accumulates greater amounts of chlorophyll content and less amounts of malondialdehyde, and shows diminished relative electrolyte leakage (Guo et al., 2016).

Interestingly, *SIMBP8*, a gene closely related to *SIMBP11*, has the opposite effect on salt tolerance in tomato. This MADS-box gene is a negative regulator of drought and high salinity stress responses in this plant as *SIMBP8*-RNAi seedling root and shoot growth are less inhibited than those of wild type seedlings growing under salt stress conditions (100 mM NaCl) and drought stress in a 5-week-old seedlings (Yin et al., 2017). These authors also found that the RNAi line, as the OE line of *SIMBP11*, has higher levels of RWC and chlorophyll content, and less amounts of relative electrolyte leakage and malondialdehyde, both in salt and drought stress (Guo et al., 2016; Yin et al., 2017).

In pepper (*Capsicum annuum*), it was shown that *CaMADS* (a MADS-box gene from the AGL2/SEP1 clade) is induced by various stress conditions (Figure 3; Table S1). Downregulation of this gene in pepper originates plants more sensitive to cold, salt stress, and mannitol treatment, that show increased malondialdehyde levels and electrolyte leakage, as well as lower levels of chlorophyll than wild type plants. Moreover, the OE of *CaMADS* in Arabidopsis plants confers a higher tolerance to cold, salt, and osmotic stress, and contributes to a better recovering capacity of the plants after cold stress conditions in comparison to wild type plants (Chen et al., 2019).

Finally, the availability of mineral nutrients is another of the most limiting resources of plant growth. Phosphorous (P)

is an essential nutrient for plant growth that can alter the root system architecture (Gruber et al., 2013; Rellán-Álvarez et al., 2016; Shahzad and Amtmann, 2017). In Arabidopsis, P deficiency inhibits primary root (PR) elongation while it increases lateral root (LR) density and length (Svistoonoff et al., 2007). Furthermore, in wheat (*Triticum aestivum*), nine out of 54 MADS-box genes are differentially regulated under P-deprivation conditions (Shi et al., 2016). One of them, *TaMADS51* that is induced under P deprivation (12 $\mu\text{mol/L}$ P), was used for functional analysis in tobacco plants grown under hydroponic conditions (Figures 2C, 3). The study showed that the OE of this MADS-box gene improves plant growth and increments plant biomass and P accumulation as well as antioxidant enzymatic activities only under P deprivation growth conditions (Figures 2C, 3; Shi et al., 2016).

2.2. Root Development

Root system architecture, i.e., the spatial arrangement of an entire root system, changes plastically in response to various environmental cues to ensure water and nutrient uptake to sustain growth and survival (Shahzad and Amtmann, 2017). In Arabidopsis, it is known that at least 50 MADS-box genes are expressed in the root (Rounsley et al., 1995), but their participation in root development in response to abiotic stress is largely unknown.

GbMADS9 is a *Ginkgo biloba* MADS-box gene involved in post-germination root growth in response to abiotic stress tolerance (Yang et al., 2016); it is an ortholog of the B sister-class genes of Arabidopsis. *GbMADS9* is upregulated in response to salt, drought and cold stresses (Figure 3); and Arabidopsis OE lines of this gene exhibited longer roots than those of wild type plants after 15 days under high osmotic stress (400 mM of mannitol). Additionally, malondialdehyde was lower, while the chlorophyll and proline levels were higher in these plants compared to those from wild type plants. Proline is an amino acid that may enhance stress tolerance because it works as an osmolyte, a metal chelator, an antioxidative defense molecule, and a signaling molecule (Hayat et al., 2012). Finally, enhanced tolerance to osmotic conditions was associated with improved superoxide dismutase and catalase antioxidant enzymatic activities in these OE lines (Yang et al., 2016). These data suggest that the increase tolerance of the OE lines of *GbMADS9*, could be dependent on the proline content and the enhance of antioxidant activities.

Nitrogen (N) is an inorganic nutrient essential for plant growth and development; it alters the root system architecture depending on the N source as well as on its concentration (Gruber et al., 2013). Vidal et al. (2010) found that Arabidopsis PR growth is inhibited while LR density is increased under 5 mM KNO_3 . In addition, Zhang et al. (1999) found a gradual increase of LR length in roots locally exposed to increasing concentrations of KNO_3 . It has also been reported that when the plants are permanently exposed to high NO_3^- concentrations (≥ 10 mM), LR production and initiation is inhibited (Zhang and Forde, 1998). These studies suggested that direct root contact to a NO_3^- source stimulates LR meristem activity, while a high amount of NO_3^- absorbed by the plant could have an inhibitory effect on it (Zhang and Forde, 1998; Zhang et al., 1999). Next, we will review

in detail the involvement of MADS-domain proteins in root system architecture changes due to alterations in nitrogen supply.

ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1 (ANR1/AGL44) is a well-known positive regulator of LR development in response to nitrate availability (Zhang and Forde, 1998). *ANR1* antisense and co-suppressed lines show inhibition of LR elongation when exposed to high N concentrations (Zhang and Forde, 1998). Interestingly, LR growth in these lines is no longer responsive to the stimulatory effect of NO_3^- supplied locally, suggesting that *ANR1* participates in the NO_3^- signal transduction pathway that modulates LR growth (Zhang and Forde, 1998). Besides, the OE of *ANR1* in plants results in a higher LR density as well as longer LRs either under control or high N conditions (Gan et al., 2012). Accordingly, the OE in Arabidopsis of one of the five rice *ANR1* orthologs, *OsMADS25*, induced LR formation, PR and LR length increments, and gains in root and shoot fresh weight in the absence of NO_3^- , compared to wild type plants. This effect is enhanced in response to increasing NO_3^- levels (Figure 3; Yu et al., 2015). Additionally, two rice OE lines of *OsMADS25* showed longer PR and LRs and a higher density of LRs than wild type plants. As expected, this gene's RNAi lines showed shorter PR and LRs and smaller LR numbers in comparison to wild type plants under high nitrate (Yu et al., 2015). Moreover, a previous study of the one published in 2015 by Yu et al., showed that diverse N sources have contrasting effects over *OsMADS25* expression levels: the gene is upregulated by KNO_3 and NH_4NO_3 , whereas it is downregulated by NH_4Cl (Table S1; Yu C et al., 2014).

AGAMOUS LIKE21 (AGL21) is a MADS-box gene highly expressed in the vascular tissue of the Arabidopsis PR and in LR primordia (Yu L.-H. et al., 2014). This gene is induced by different environmental stresses and plant hormone treatments (Figure 1 and Table S1), suggesting participation in root plasticity (Yu L.-H. et al., 2014). *AGL21* OE lines produce higher numbers and longer LRs both under N-deficient and N-rich conditions (20 mM KNO_3 and 20 mM NH_4NO_3), while the loss of function mutant produces fewer and shorter LRs than wild type plants in either N-growing conditions. This data revealed that LR responses to nitrogen availability in *AGL21* mutant lines, are not directly proportional to the concentration used. Finally, *AGL21* positively regulates cell division in LR primordia and LRs, but PR length was not affected either in *AGL21* OE or in loss of function lines (Figure 2E; Yu L.-H. et al., 2014).

2.3. Involvement of MADS-Box Genes in Flower Development

Tomato flowers are very sensitive to low temperatures, displaying three different phenotypes, or combinations of them, after facing cold stress: floral organ homeotic changes, modifications in organ number, and differences in the pattern of organ fusion (Lozano et al., 1998). Interestingly, several MADS-box genes, including *TOMATO APETALA3*, are highly induced under cold stress conditions (Table S1), suggesting that differential expression of MADS-box genes could be responsible for these plastic phenotypical alterations (Lozano et al., 1998).

Stamens are the male reproductive organs, consisting of a filament and an anther in which microspores are produced. It

has been shown that temperature influences sexual reproduction (Kim et al., 2001; Bokszczanin, 2013), specifically, the development and functioning of male gametophyte in monocot and dicot species (Müller et al., 2016). Stamen specification is regulated by a tetramer integrated by the MADS-domain proteins AP3, PI, AG, and SEP (Theissen and Saedler, 2001).

Tomato develops many different stamen phenotypes under continuous mild heat conditions (32°C day, 26°C night). They include loss of pollen viability and deformation of some of the anthers into pistil-like structures. The frequency of appearance of these phenotypes is not constant, it increases as temperature rises. The homeotic transformation of the anthers suggested that the expression patterns of B and C class genes from tomato should be analyzed: two AP3 genes, *TAP3* and *TOMATO MADS BOX GENE6 (TM6)*, two PI genes, *LePISTILLATA (LePI)* and *TOMATO PISTILLATA*, and two C-class genes *TOMATO AGAMOUSI* and *TAG-LIKE1*. Müller et al. (2016) showed that, under mild heat conditions, the expression of *TM6*, *TAP3*, and *LePI* is repressed in anthers while the other MADS-box genes do not change their expression (Figure 3). They decided to use a *TM6*-RNAi allele and observed weak anther-to-pistil conversions under control conditions (25°C day, 19°C night) while, under a regimen of mild heat conditions (32°C/26°C day/night) several phenotypes appeared, such as strong anther deformation, reduced male fertility, and less pollen production with lower viability than wild type plants, resembling plants growing at high temperatures. These data demonstrate that reduction in the expression of the MADS-box gene *TM6* mimics phenotypes obtained with high-temperature growth conditions in tomato plants. Interestingly, plants overexpressing *AtGRXS17*, a glutaredoxin that confers heat tolerance when overexpressed, show fewer anther deformities under mild heat conditions than wild type plants. Moreover, these plants also show an increment in the expression of *TAP3* (Müller et al., 2016).

In rice, *OsMADS3*, an AG ortholog, is expressed in the tapetum and in microspores during late anther development stage. A knockout line of this gene (*osmads3-3*) shows homeotic transformation of stamens into lodicules (Yamaguchi et al., 2006). In another study, null expression mutant, *osmads3-4*, is male sterile and exhibits defects in pollen development due to oxidative stress, suggesting that *OsMADS3* regulates anther development (Hu et al., 2011). Using chromatin immunoprecipitation and electrophoretic mobility shift assay, it (Hu et al., 2011) showed that *OsMADS3* regulates directly the expression of *MT-1-Ab*, a gene encoding a metal binding protein that functions as a ROS-scavenger. Furthermore, silencing of *MT-1-Ab* by an artificial miRNA (*MT-1-Ab*-amiRNA) provoked defects in anther's development and reduced mature pollen grain formation (Figure 3). Finally, these authors also showed that *OsMADS3* affects the expression of many other ROS-scavenging enzymes, suggesting that this MADS-box gene regulates male reproductive development, in part, through ROS homeostasis. It has been demonstrated that ROS participate in multiple developmental processes like root and flower development, meristem specification, and seed germination (Tsukagoshi et al., 2010; Schippers et al., 2016; Zeng et al., 2017). Under normal

conditions, ROS production in plants is low, while under stress conditions, it is highly induced and may provoke cellular damage. However, it has also been suggested that ROS molecules may play a role in stress signaling (Price and Hendry, 1991; Mittler, 2002).

2.4. Seed Development

Seeds enclose embryonic plants and are essential to determining when and where plants should establish themselves. Seed germination starts with initial water uptake by a quiescent dry seed and terminates with the elongation of the embryonic axes and the emergence of the embryonic root (Bassel et al., 2011). This developmental process is highly regulated by temperature and water availability. Also, under adverse conditions, seed germination is arrested (dormancy), allowing the plant to survive. Two plant hormones are important in this developmental process as ABA delays germination, whereas gibberellic acid (GA) promotes it (Shu et al., 2016).

In Arabidopsis, Yu et al. (2017) showed that *AGL21*, besides its role in LR development, functions as a negative regulator of seed germination under osmotic stress conditions. While OE of *AGL21* affects germination rate and seeds become hypersensitive to salt stress (150 mM NaCl), to severe osmotic stress (300 mM mannitol), and to ABA, the germination rate of the *AGL21* loss of function lines is less affected than that of wild type plants under these stressful conditions (Figures 1, 2F). Interestingly, the authors demonstrated that *AGL21* is involved in ABA signaling as it directly regulates the expression of *ABA INSENSITIVE 5 (ABI5)*; furthermore, they also showed that *AGL21*-regulated seed germination depends on *ABI5*.

Another gene involved in seed development in Arabidopsis is *AGL15*. The OE lines of this gene retard silique maturation and seed desiccation. Besides, seeds have a higher water potential for a longer period of time than seeds from control plants (Figure 1; Fang and Fernandez, 2002).

In rice, it has been shown that several Type I MADS-box genes participate in early seed formation during the syncytial stage of development that, among other things, determines seed size (Folsom et al., 2014). Chen et al. (2016) showed that the expression of three rice MADS-box genes, *OsMADS82*, *OsMADS87*, and *Os1g30220*, is reduced upon heat treatment (from mild 35°C/30°C to severe 39°C/34°C day/night) for 48 h after fertilization (Figure 3). Also, rice seed size and seed viability are reduced during heat treatment because the transition from syncytium to cellularization accelerates. Thus, the authors decided to study the function of one of these genes, *OsMADS87*, in rice mutant lines (Chen et al., 2016). They found that decreasing *OsMADS87* expression through RNAi transgenic rice lines growing under normal conditions accelerates endosperm cellularization and reduces seed size. On the other hand, the OE of this gene does not change endosperm cellularization but produces larger seeds at maturity compared to wild type seeds. In heat stressed plants (35°C) the OE and the wild type lines show reduced seed size compared to control conditions, while the RNAi lines are not further affected (Chen et al., 2016). These data suggest that *OsMADS87* participates

in endosperm cellularization and seed size in response to heat stress.

2.5. Flowering Time

Flowering is a developmental stage that involves the transition from vegetative growth to a reproductive phase where flowers are produced; this developmental stage is tightly regulated by both endogenous and environmental cues (Hepworth and Dean, 2015; Kazan and Lyons, 2016). Complex regulatory networks underlie this transition, where MADS-box genes play central roles not only in the transition itself, but also in the shoot apical meristem homeostasis and floral organ identity (Srikanth and Schmid, 2011; Andrés and Coupland, 2012; Bloomer and Dean, 2017; Whittaker and Dean, 2017; Wils and Kaufmann, 2017).

Flowering is regulated by several environmental factors including photoperiod, light quality, and temperature. It is also regulated by different types of stress conditions such as drought, temperature, oxidative, and salt stress (Blázquez and Weigel, 2000; Onouchi et al., 2000; Samach et al., 2000; Blázquez et al., 2003; Moon et al., 2003; Balasubramanian et al., 2006). In this section, we will review how MADS-box genes participate in the coordination of the response to stress conditions during the vegetative to flowering transition.

In Arabidopsis, flowering time is determined by the expression of the so-called floral pathway integrators (FPIs), including *LEAFY*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), and *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (Blázquez and Weigel, 2000; Lee et al., 2000; Onouchi et al., 2000; Samach et al., 2000; Moon et al., 2003, 2005). These genes are antagonistically regulated by two TFs: *CONSTANS* (*CO*), encoding a zinc finger protein, and *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), encoding a MADS-box TF (Michaels and Amasino, 1999; Lee et al., 2000; Samach et al., 2000). During the transition to flowering, *FLC* functions as part of a repressor complex together with another MADS-domain protein, *SVP* (Lee et al., 2007; Li et al., 2008).

During drought stress, one of the major morphological changes in angiosperms, is the early transition from vegetative to reproductive phase in order to complete their life cycle and make seeds before the stress conditions become too severe, leading to the plant's death. This mechanism of drought escape has been reported in several plant species (Xu et al., 2005; Franks et al., 2007; Franks, 2011; Su et al., 2013; Ma et al., 2014). In Arabidopsis, the onset of a drought escape response (in Col-0 and Ler-1 accessions) is controlled by the photoperiod; it is triggered by long day conditions (16 h light/ 8 h dark, LD) and slight but significantly repressed (only in Col-0) under short days (8 h light/16 h dark, also, short photoperiod, SD; Riboni et al., 2013). These opposite responses partially depend both on ABA, as ABA biosynthesis mutants flower later than wild type in control and in stress conditions, and on the expression of three MADS-box genes, *SOC1*, *FLC*, and *SVP* (Figure 1). Moreover, *SOC1* expression is induced by drought under a LD photoperiod in an ABA-dependent way; in addition, the *soc1-2* loss of function mutant strongly reduced the drought escape response under LD, and have a late flowering phenotype under this condition. On the other hand, under SD, the drought response is strongly dependent upon *FLC* / *SVP* complex repressor activity (Riboni

et al., 2013, 2016). Under SD drought conditions, loss of function *syp-41* mutants recover the drought escape response (Figure 2D) and *flc-6* mutants show no alteration in their flowering time. Riboni et al. (2013) proposed that the adaptive significance for the interaction between drought and photoperiodic conditions relies upon limiting the floral transition to drought episodes that occur only in spring LD when environmental conditions allow plants to fulfill their life cycle and preventing them from occurring during SD of autumn, when environmental conditions are not favorable.

ROS are normally produced in mitochondria and chloroplasts by specific enzymes. Although these molecules may function in signaling, they could also be harmful for many biomolecules (Birben et al., 2012). One of the strategies that cells use to cope with oxidative stress is the synthesis of antioxidant enzymes such as peroxidases (Birben et al., 2012). *PRX17* is a class III peroxidase present in all plant tissues, especially in young floral buds; intracellularly, it localizes in the cell wall and is important for lignin biosynthesis (Cosio et al., 2017). It has also been shown that *PRX17* functions as a flower promoter, as *PRX17* loss of function impairs the transition to flowering while the OE line of this gene exhibits a slightly early flowering phenotype. Interestingly, the OE of the MADS-box gene *AGL15* is late flowering and the protein binds to *PRX17* promoter, repressing its expression. Moreover, *AGL15* not only regulates peroxidase expression but also the protein activity suggesting that part of the late flowering phenotype of the OE of *AGL15* depends on the repression of *PRX17* (Cosio et al., 2017). Additionally, *SIMBP11*, the *AGL15* ortholog from tomato (see section 2.1), positively regulates the expression of catalase and other peroxidases, suggesting a general function of *AGL15* and its orthologs as ROS regulators.

Cold stress responses occur after a short exposure to either chilling (<20°C) or freezing (<0°C) conditions (Chinnusamy et al., 2007). Under these stressful conditions, plants show different phenotypes such as chlorosis, reduced leaf expansion, poor germination, and delayed flowering (Barah et al., 2013; Jeon and Kim, 2013). Low temperature stress induces fast transcriptional responses in plants, characterized by the activation of the cold response pathway ICE-CBF-COR (ICE: inducer of CBF expression; CBF: C-Repeat Binding Factor, and COR: Cold Regulated) that, in turn, regulates more than 100 target genes needed to withstand cold (Seo et al., 2009; Wang et al., 2017).

The MADS-box gene *SOC1* not only integrates diverse floral inductive pathways (Boss et al., 2004) but also participates in a crosstalk between cold sensing and flowering. *SOC1* negatively regulates cold response genes; for instance, the loss of function of this gene (*soc1-2*) induces the expression of several COR and CBFs genes, while in the OE line (*soc1-101D*), these genes are repressed (Seo et al., 2009). Chromatin Immunoprecipitation analysis showed that *SOC1* repressed directly the expression of the three CBF genes (Seo et al., 2009). As mentioned, CBFs are known TFs that coordinate the expression of many genes related to cold stress responses, their OE in Arabidopsis not only activates COR genes but also *FLC* expression (a negative regulator of *SOC1*) and causes late flowering as well as tolerance to freezing conditions (Gilmour et al., 2004; Seo et al., 2009). Interestingly, these cross regulation, creates a loop between cold response signaling and flowering regulation (Figure 1).

Other MADS-domain proteins that negatively regulate the expression of *FT* and the transition to flowering in response to changes in temperature in Arabidopsis are SVP and FLOWERING LOCUS M (*FLM*, also known as *MAF1* and *AGL27*). *FLM*, as SVP, represses the expression of the FPIs and functions as a negative regulator of flowering at low-temperature conditions (16°C, Lee et al., 2007, 2013; Posé et al., 2013). Interestingly, the *FLM* transcript shows alternative splicing with a different number of splice variants that depend on temperature growth conditions and the plant ecotype. Arabidopsis Col-0 has two splice variants that are, translated; the *FLM-β* delays flowering when overexpressed, whereas the OE of *FLM-δ* induces early flowering (Figure 1; Scortecci et al., 2003; Posé et al., 2013). Posé et al. (2013) showed that the relative accumulation of the two splice variant transcripts in Col-0 is also temperature-dependent, with *FLM-β* being the predominant form at 16°C while *FLM-δ* is the most abundant variant at 27°C. The data lead to the hypothesis that these two variants compete for the interaction with SVP at both temperatures. Moreover, it has been shown that SVP/*FLM-β* heterodimer is able to bind DNA, whereas the SVP/*FLM-δ* complex is impaired in DNA binding and may function as a dominant negative isoform. However, recent studies contradict this hypothesis by demonstrating that *FLM-δ* does not exercise a dominant-negative effect (Capovilla et al., 2017; Melzer, 2017). Additionally, other studies showed that at 16°C the splice variant *FLM-β* is more abundant than *FLM-δ*, but at 27°C the copy number of both splice variants was the same (Lee et al., 2013); and it was also shown that the level of *FLM-β* rather than the *FLM-β/FLM-δ* ratio controls flowering responses to high temperature (Figure 1; Sureshkumar et al., 2016; Lutz et al., 2017). Furthermore (Lee et al., 2013), have shown that the regulation of flowering upon temperature sensing depends also on the degradation of the SVP protein at high temperatures (Lee et al., 2013).

3. MADS-BOX GENES ARE KEY IN MODULATING DEVELOPMENTAL RESPONSES TO SEASONAL TEMPERATURE CHANGES

Plant responses to various environmental conditions can alter the timing of initiation and the duration of different developmental events; moreover, the transition to different plant developmental processes, such as flowering, seed dormancy and germination, and bud dormancy and release, require specific environmental changes to occur. For example, many plants require a process known as vernalization (a prolonged exposition to cold conditions) to optimize flowering time with environmental conditions that ensure the maximum fitness (Sung and Amasino, 2005; Bäurle and Dean, 2006; Shu et al., 2016; Whittaker and Dean, 2017). In this section, we will focus on the participation of several MADS-box genes in seasonal low temperature-dependent developmental processes such as vernalization, seed germination, and bud dormancy and release.

3.1. Vernalization

Arabidopsis vernalizes at a wide range of temperatures (0–16°C) (Wollenberg and Amasino, 2012; Duncan et al., 2015), and the process leads to cold-induced epigenetic silencing of *FLC* (Figure 1; Bloomer and Dean, 2017). *FLC* is a protein that represses flowering transition by repressing flowering gene promoters, such as *FT* and *SOC1*. Upon vernalization, *FLC* expression and protein levels decrease so the FPIs are expressed and flowering is induced (Michaels and Amasino, 1999, 2001; Sheldon et al., 1999, 2000; Johanson et al., 2000; Rouse et al., 2002; Sung and Amasino, 2005; Whittaker and Dean, 2017). Moreover, repression of *FLC* involves epigenetic changes in histones, specifically an enrichment of trimethylated H3 lysine 27 (H3K27me3) and depletion of trimethylated H3 lysine 4 (Finnegan and Dennis, 2007; Yang et al., 2014).

Furthermore, and according to the data shown above, CBF transcription factors induce the expression of *FLC*, and this could explain the late-flowering phenotype of plants growing in cold stress conditions. However, in vernalization treatments where plants are exposed to prolonged cold conditions, CBFs genes are upregulated but *FLC* expression is inhibited. This suggests that vernalization reverses the cold stress CBFs' induction over *FLC* expression and that these two treatments affect flowering transition via distinct mechanisms (Seo et al., 2009).

In Arabidopsis, *FLC* has five paralogs (*MADS AFFECTING FLOWERING*, *MAF1* to *MAF5*), whose proteins show between 53 to 87% of identity (De Bodt et al., 2003; Ratcliffe et al., 2003). Similar to *FLC*, almost all *MAF* genes are regulated by vernalization: *FLM* (*MAF1*), *MAF2*, and *MAF3* are repressed, whilst *MAF5* is induced and *MAF4* is not affected (Ratcliffe et al., 2001, 2003). The loss of function mutant of *FLM* (*flm-1*) has an early flowering phenotype, while the OE of this gene retards flowering (Figure 1; Ratcliffe et al., 2001; Scortecci et al., 2001). In addition, *MAF2* is involved both in the vernalization process (Ratcliffe et al., 2003) and in the flowering transition of plants exposed to short treatments of cold stress. The loss of function mutant of this gene (*maf2*) flowered disproportionately early when growing in short-duration cold treatments that do not elicit full vernalization in wild type plants; besides, regulation by *MAF2* was shown to be independent of *FLC* expression. These data suggest that *MAF2* regulates the repression of premature vernalization in response to brief cold treatments (Ratcliffe et al., 2003). In the Landsberg accession, the OE of *FLC* and of *MAF1-MAF5* produced late-flowering lines (Michaels and Amasino, 1999; Ratcliffe et al., 2003), and the OE lines of *MAF2* are unable to respond to vernalization due to a continuous repression of *SOC1* (Ratcliffe et al., 2003).

The molecular mechanism activated in Arabidopsis in response to vernalization is conserved in temperate cereals (Greenup et al., 2010; Ruelens et al., 2013). In this group, vernalization response is regulated by the MADS-box gene *VERNALIZATION1* (*VRN1*) in wheat and by its ortholog *Vrn1-H1* in barley (Trevaskis et al., 2003). These genes are flowering promoters induced by vernalization, in an opposite manner to *FLC* (Danyluk et al., 2003; Yan et al., 2003; Sasani et al., 2009). In wheat and barley, the expression of *VRN1* genes, in plants not exposed to vernalization, depends on the cultivar

and its requirements: high in spring lines that flower without vernalization, moderate in semi-spring lines, and null in winter lines that require vernalization to flower. Accordingly, the expression of *VRN1* in plants under vernalization correlates with the lines used: strongly induced in winter lines and weakly induced in spring lines (Trevaskis et al., 2003).

In plant perennial species, flowering continues throughout the lifespan of the plant, alternating vegetative and reproductive development. Interestingly, in *Arabis alpina*, a perennial plant, the expression of the *FLC* ortholog *PERPETUAL FLOWERING 1 (PEP1)* depends on the external temperature, being upregulated in warm temperatures and downregulated in cold environments (Figure 3). Moreover, and contrary to what happens with *FLC*, *PEP1* expression is high after a vernalization treatment, correlating with the absence of H3K27me3 marks (Wang et al., 2009). Functional analysis using the loss of function mutant of *PEP1 (pep1)* showed that this gene is important to prevent flowering before vernalization and to facilitate the return to vegetative development, thus, restricting the duration of flowering. In addition, the OE of *PEP1* lines were late-flowering. These data suggest that *PEP1* expression is one of the mechanisms that *A. alpina* uses to perceive external temperature to be able to transit between flowering and vegetative development (Wang et al., 2009).

CO and *FT*-like genes have also been identified in barley and some grass species but their functions in flowering have not been described (Turner et al., 2005; King et al., 2006; Yan et al., 2006; Faure et al., 2007). Finally, another MADS-box gene with weak similarity to *SOC1*, *HvOS2* was found in barley (*Hordeum vulgare*) and its transcript levels decrease during vernalization in a pattern similar to that of *FLC* in Arabidopsis (Figure 3). However, although this gene does not contain the H3K27me3 deposition mark, its OE (*HvOS2*) delays flowering (Greenup et al., 2010).

3.2. Low Temperature-Dependent Germination

FLC is not only important for flowering but also participates in seed germination in response to seasonal environmental factors such that higher levels of *FLC* in OE lines, or in Arabidopsis accessions with different levels of *FLC*, provoke significantly elevated rates of germination at cool temperatures (10°C) compared to those at 22°C (Chiang et al., 2009). Moreover, it was also demonstrated that this *FLC* phenotype is dependent on the levels of ABA and GA, the two most important hormones for the initial stages of germination. In accessions with a strong *FLC* allele or in the OE lines of this gene, the expression of *CYP707A2*, a gene that participates in the catabolism of ABA, and *GA20ox1*, a gene that participates in the synthesis of GA, are upregulated. Additionally, and according to *FLC*-dependent germination models, the mutants of two other MADS-box genes related to flowering transition, *APETALA1 (ap1-1)* and *soc1*, showed higher germination percentages at cool temperatures than wild type plants (Chiang et al., 2009).

3.3. Bud Dormancy and Release

Dormancy could be seen as a survival strategy during periods where the environmental conditions are adverse for growth. In perennial plants of temperate climates, the induction of bud dormancy by winter cold temperature and SD is a phenological adaptive feature which ensures optimal protection of vegetative and reproductive meristems against unfavorable environmental conditions (Bielenberg et al., 2008; Ríos et al., 2014). This latent state implies a reduction in meristematic cell proliferation activity; in addition, during the initial steps of dormancy formation, there is an increase in ABA levels and accumulation of storage compounds, as well as an active gene regulation engaged in the acquisition of desiccation and cold tolerance (Rohde and Bhalerao, 2007; Ruttink et al., 2007). Furthermore, SD induces bud dormancy by activating the ABA response (Singh et al., 2019). On the other hand, dormancy release requires resuming cell division, changes in some developmental programs regarding hormone accumulation, sugar metabolism, and epigenetic regulation. Moreover, for this transition to occur, exposition to a certain period of chilling temperatures is required, which could act as an active biological regulator more than as a stress signal (Horvath et al., 2003; David Law and Suttle, 2004; Rohde and Bhalerao, 2007; Liu et al., 2015).

Interestingly, the process of bud dormancy release in perennials presents similarities with the vernalization mechanism for flowering in Arabidopsis and cereals (Considine and Foyer, 2014); both processes require the occurrence of an extended chilling period, they are affected by photoperiod, and, in both processes, MADS-domain TFs are key regulatory elements (Chouard, 1960; Horvath et al., 2003; Hemming and Trevaskis, 2011). The MADS-box genes *DORMANCY-ASSOCIATED MADS-box (DAM)* have been implicated in regulating bud dormancy induction and release in woody plants. The first study made on peach (*Prunus persica*) indicated the participation of a cluster of six tandemly repeated *PpDAMI-PpDAM6* genes that are orthologs to *SVP* and *AGAMOUS LIKE24* from Arabidopsis (Bielenberg et al., 2004, 2008; Jiménez et al., 2009). Deletion of all six DAM genes in the *evergrowing* peach mutant provokes a constant growth of terminal meristems facing winter conditions, and in SD, the plants are also unable to form buds, displaying half the frost hardiness shown by wild type dormant trees (Figure 3; Rodriguez-A et al., 1994; Bielenberg et al., 2008).

Furthermore, there is a lot of molecular evidence that shows that *DAM*-like genes are differentially regulated during dormancy induction and release in various plant species (Leseberg et al., 2006; Mazzitelli et al., 2007; Horvath et al., 2008, 2010; Yamane et al., 2008, 2011; Hedley et al., 2010; Ubi et al., 2010; Sasaki et al., 2011; Wu et al., 2012; Saito et al., 2013). Additionally, *DAM* genes have been identified in quantitative trait loci that affect bud dormancy (Ruttink et al., 2007; Fan et al., 2010; Rohde et al., 2011; Sánchez-Pérez et al., 2012; Romeu et al., 2014; Zhebentyayeva et al., 2014).

Finally, the OE of *DAM* genes yield different developmental alterations. For example, the OE of *DAM6* in transgenic plums (*Prunus domestica*) results in plants with some degree of dwarfing and increased branching (Fan et al., 2010), and the OE of

the *PmDAM6* in a poplar hybrid (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) promotes growth cessation and dormancy onset under favorable conditions (Sasaki et al., 2011). Also, the OE of a DAM ortholog of apple (35S:*MdDAM6*; *Malus domestica*, “Royal Gala”) delays the timing of spring budbreak and produces plants displaying a dominant main stem with few lateral shoots (Wu et al., 2017a). Noteworthy, Horvath et al. (2008) suggested that the interaction between DAM proteins and FT is fundamental for dormancy transitions, resembling the interactions among these genes’ orthologs during flowering transition.

There are still some other MADS-box genes whose expression changes during dormancy transitions and that have been functionally characterized (Horvath et al., 2008). For instance, the ortholog of *SVP* (a repressor of flowering) of aspen plants, *SHORT VEGETATIVE PHASE-LIKE* (*SVL*), is downregulated by exposure to low temperatures, upregulated by ABA, and induced by SD in an ABA-dependent pathway (Singh et al., 2018, 2019). Moreover, loss of function of *SVL* plants (*SVL-RNAi*) showed early budbreak, while OE plants display late budbreak compared to wild type plants (Singh et al., 2018). In addition, the OE of *SLV* in *abil-1* loss of function mutants rescues dormancy regulation (Singh et al., 2019). *SVL* directly and positively regulates the expression of an enzyme that participates in callose deposition, *CALLOSE SYNTHASE 1*, involved in plasmodesmatal closure important to promote dormancy (Singh et al., 2019). Besides, it negatively regulates the expression of one of the *FT* poplar orthologs (*FT1*) that participates in dormancy release (Busov, 2019).

The *SVP* ortholog is also important for bud dormancy release in kiwifruit (*Actinidia* spp.). This plant requires a minimum number of chilling hours so that buds can reinduce growth; however, chilling requirements vary among different species (Lionakis and Schwabe, 1984; Snelgar et al., 2007). Ectopic expression of *SVP2* in a low-chill kiwifruit *Actinidia eriantha* had a minimal effect on the duration of dormancy while it greatly affected the duration of dormancy in a high-chill kiwifruit *A. deliciosa* (Figure 3; Wu et al., 2012, 2017b).

Also, in apple, the ectopic expression of an ortholog of *SVP* (35S:*MdSVPa*) delayed bud release (Wu et al., 2017a). Furthermore, there are some reports of *SVP* ortholog regulation in different plants during the onset and release of dormancy (Mazzitelli et al., 2007; Yamane et al., 2008; Diaz-Riquelme et al., 2009; Horvath et al., 2010; Wu et al., 2012).

In addition, it has also been shown that the OE of the *FUL*-like gene of *Populus* in birch (*Betula pendula*) resulted in delayed dormancy (Hoenicka et al., 2008). Moreover, a *SOC1*-like gene was upregulated in poplar (*Populus tremula* x *Populus alba*) during bud formation when induced by variations in the photoperiod (Ruttink et al., 2007). Additionally, a *SOC1*-like gene was expressed at higher levels relative to other tissues in developing buds of white spruce (*Picea glauca*), implying that this MADS-box could play a specialized role in bud development (El Kayal et al., 2011). Also, different allelic variants of the *SOC1*-like gene of apricot are associated with different chilling requirements for dormancy release (Trainin et al., 2013).

Nevertheless, despite all these works, little is known about how MADS-box genes contribute to the maintenance of bud dormancy and dormancy release, functional investigations are

still required to determine the role played by DAM and other MADS-box genes in the activity-dormancy cycle, together with the identification of their target genes (Cooke et al., 2012). Even so, these data support the parallelism between regulation of bud dormancy and vernalization.

4. CONCLUSIONS

Alterations in gene regulation are among the most significant mechanisms for phenotypic change (Hoekstra and Coyne, 2007); within these, TFs can function as developmental switches given their capacity to reprogram gene expression. It has also been shown that TFs are important in regulating plant responses to environmental stress along their lifespan. Moreover, it has been shown that small changes in some key TFs determine the evolution of different processes and structures. Specifically, TFs of the MADS-box gene family are central regulators of every aspect of Arabidopsis development as shown by mutant analysis. Several data also suggest that distinct MADS-box genes not only alter their expression levels when facing different stress conditions but that they are involved in mediating plant responses or tolerance to a wide range of abiotic stresses, addressing their importance as integrators of environmental cues and endogenous hormones in a taxonomically broad range of plant species. Some MADS-box genes act as critical negative regulators of growth improving plant survival, while others function as positive regulators of stress tolerance, associated with regulating the maintenance of primary metabolism, ABA signaling, ROS homeostasis, and detoxification processes through antioxidant enzymatic activities. Despite these studies, many mechanisms whereby MADS-box genes coordinate the transcriptional response to abiotic stress remain to be identified.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NC-M, JH, and AG-A conceived and wrote the paper. WC-S, MA, CT, BG-P, MS, and EA-B wrote the paper. All authors read and approved the final version.

FUNDING

EA-B, AG-A, MS, and BG-P received funding from CONACYT: 240180 and 180380 and UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN211516, IN208517, IN205517, and IN204217. NC-M and JH were financially supported by CONACYT through Ph.D. scholarships. MA received a posdoctoral fellowship from UNAM-DGAPA.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Diana Romo for support on logistical work and Diana Belén Sánchez Rodríguez for technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00853/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Alvarez-Buylla, E. R., Pelaz, S., Liljegren, S. J., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., et al. (2000). An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5328–5333. doi: 10.1073/pnas.97.10.5328
- Andrés, F., and Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13, 627–639. doi: 10.1038/nrg3291
- Arora, R., Agarwal, P., Ray, S., Singh, A. K., Singh, V. P., Tyagi, A. K., et al. (2007). MADS-box gene family in rice: Genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics* 8:242. doi: 10.1186/1471-2164-8-242
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., and Weigel, D. (2006). Potent induction of arabidopsis thaliana flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.* 2:e106. doi: 10.1371/journal.pgen.0020106
- Barah, P., Jayavelu, N., Rasmussen, S., Nielsen, H., Mundy, J., and Bones, A. M. (2013). Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten Arabidopsis thaliana ecotypes. *BMC Genomics* 14:722. doi: 10.1186/1471-2164-14-722
- Bartels, D., and Sunkar, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 24, 23–58. doi: 10.1080/07352680590910410
- Bartlett, M. E. (2017). Changing MADS-box transcription factor protein-protein interactions as a mechanism for generating floral morphological diversity. *Integr. Comp. Biol.* 57, 1312–1321. doi: 10.1093/icb/ixc067
- Bassel, G. W., Lan, H., Glaab, E., Gibbs, D. J., Gerjets, T., Krasnogor, N., et al. (2011). Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 9709–9714. doi: 10.1073/pnas.1100958108
- Bäurle, I., and Dean, C. (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125, 655–664. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.005
- Bechtold, U., Penfold, C. A., Jenkins, D. J., Legaie, R., Moore, J. D., Lawson, T., et al. (2016). Time-series transcriptomics reveals that AGAMOUS-LIKE22 affects primary metabolism and developmental processes in drought-stressed arabidopsis. *Plant Cell* 28, 345–366. doi: 10.1105/tpc.15.00910
- 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. Phylogenet. Evol.* 29, 464–489. doi: 10.1016/S1055-7903(03)00207-0
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Fan, S., Reighard, G. L., Scorza, R., and Abbott, A. G. (2004). A deletion affecting several gene candidates is present in the Evergrowing peach mutant. *J. Hered.* 95, 436–444. doi: 10.1093/jhered/esh057
- Bielenberg, D. G., Wang, Y. E., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G. L., et al. (2008). Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genet. Genomes* 4, 495–507. doi: 10.1007/s11295-007-0126-9
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613
- Blázquez, M. A., Ahn, J. H., and Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nat. Genet.* 33, 168–171. doi: 10.1038/ng1085
- Blázquez, M. A., and Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* 404, 889–892. doi: 10.1038/35009125
- Bloomer, R. H., and Dean, C. (2017). Fine-tuning timing: natural variation informs the mechanistic basis of the switch to flowering in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* 68, 5439–5452. doi: 10.1093/jxb/erx270
- Bokszczanin, K. (2013). Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Front. Plant Sci.* 4:315. doi: 10.3389/fpls.2013.00315
- 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(Suppl. 1):S18–31. doi: 10.1105/tpc.015958
- Boyer, J. S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218, 443–448. doi: 10.1126/science.218.4571.443
- Brambilla, V., Battaglia, R., Colombo, M., Masiero, S., Bencivenga, S., Kater, M. M., et al. (2007). Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2544–2556. doi: 10.1105/tpc.107.051797
- Busov, V. B. (2019). Plant development: dual roles of poplar SVL in vegetative bud dormancy. *Curr. Biol.* 29, PR68–R70. doi: 10.1016/j.cub.2018.11.061
- Callens, C., Tucker, M. R., Zhang, D., and Wilson, Z. A. (2018). Dissecting the role of MADS-box genes in monocot floral development and diversity. *J. Exp. Bot.* 69, 2435–2459. doi: 10.1093/jxb/ery086
- Cao, Y., Wang, L., Zhao, J., Zhang, H., Tian, Y., Liang, H., et al. (2016). Serum response factor protects retinal ganglion cells against high-glucose damage. *J. Mol. Neurosci.* 59, 232–240. doi: 10.1007/s12031-015-0708-1
- Capovilla, G., Symeonidi, E., Wu, R., and Schmid, M. (2017). Contribution of major FLM isoforms to temperature-dependent flowering in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* 68, 5117–5127. doi: 10.1093/jxb/erx328
- Chaves, M. M., and Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* 55, 2365–2384. doi: 10.1093/jxb/erh269
- Chen, C., Begcy, K., Liu, K., Folsom, J. J., Wang, Z., Zhang, C., et al. (2016). Heat stress yields a unique MADS box transcription factor in determining seed size and thermal sensitivity. *Plant Physiol.* 171, 606–622. doi: 10.1104/pp.15.01992
- Chen, L., Zhao, Y., Xu, S., Zhang, Z., Xu, Y., Zhang, J., et al. (2018). OsMADS57 together with OsTB1 coordinates transcription of its target OsWRKY94 and D14 to switch its organogenesis to defense for cold adaptation in rice. *New Phytol.* 218, 219–231. doi: 10.1111/nph.14977
- Chen, R., Ma, J., Luo, D., Hou, X., Ma, F., Zhang, Y., et al. (2019). CaMADS, a MADS-box transcription factor from pepper, plays an important role in the response to cold, salt, and osmotic stress. *Plant Sci.* 280, 164–174. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.11.020
- Chiang, G. C. K., Barua, D., Kramer, E. M., Amasino, R. M., and Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11661–11666. doi: 10.1073/pnas.0901367106
- Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12, 444–451. doi: 10.1016/j.tplants.2007.07.002
- Cho, J. (2018). Transposon-derived non-coding RNAs and their function in plants. *Front. Plant Sci.* 9:600. doi: 10.3389/fpls.2018.00600
- Chouard, P. (1960). Vernalization and its relations to dormancy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 11, 191–238. doi: 10.1146/annurev.pp.11.060160.001203
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., and Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J.* 90, 856–867. doi: 10.1111/tplj.13299
- Comstock, J. P. (2002). Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *J. Exp. Bot.* 53, 195–200. doi: 10.1093/jexbot/53.367.195
- Considine, M. J., and Foyer, C. H. (2014). Redox regulation of plant development. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 1305–1326. doi: 10.1089/ars.2013.5665
- Cooke, J. E., Eriksson, M. E., and Junntila, O. (2012). The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant, Cell Environ.* 35, 1707–1728. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02552.x
- Cosio, C., Ranocha, P., Francoz, E., Burlat, V., Zheng, Y., Perry, S. E., et al. (2017). The class III peroxidase PRX17 is a direct target of the MADS-box transcription factor AGAMOUS-LIKE15 (AGL15) and participates in lignified tissue formation. *New Phytol.* 213, 250–263. doi: 10.1111/nph.14127
- Danyluk, J., Kane, N. A., Breton, G., Limin, A. E., Fowler, D. B., and Sarhan, F. (2003). TaVRT-1, a putative transcription factor associated with vegetative to reproductive transition in cereals. *Plant Physiol.* 132, 1849–1860. doi: 10.1104/pp.103.023523
- David Law, R., and Suttle, J. C. (2004). Changes in histone H3 and H4 multi-acetylation during natural and forced dormancy break in potato tubers. *Physiol. Plant.* 120, 642–649. doi: 10.1111/j.0031-9317.2004.0273.x
- Davies, B., Egea-Cortines, M., de Andrade Silva, E., Saedler, H., and Sommer, H. (1996). Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO J.* 15, 4330–4343. doi: 10.1002/j.1460-2075.1996.tb00807.x
- Davies, W. J., and Zhang, J. (1991). Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 55–76.
- De Bodt, S., Raes, J., Florquin, K., Rombauts, S., Rouzé, P., Theißen, G., et al. (2003). Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *J. Mol. Evol.* 56, 573–586. doi: 10.1007/s00239-002-2426-x

- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C. A., Taylor, J. M., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 6680–6685. doi: 10.1073/pnas.1103175108
- Diaz-Riquelme, J., Lijavetzky, D., Martínez-Zapater, J. M., and Carmona, M. J. (2009). Genome-wide analysis of MIKCC-type MADS box genes in grapevine. *Plant Physiol.* 149, 354–369. doi: 10.1104/pp.108.131052
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., and Yanofsky, M. F. (2004). The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity. *Curr. Biol.* 14, 1935–1940. doi: 10.1016/j.cub.2004.10.028
- Duncan, S., Holm, S., Questa, J., Irwin, J., Grant, A., and Dean, C. (2015). Seasonal shift in timing of vernalization as an adaptation to extreme winter. *Elife* 4, 1–11. doi: 10.7554/eLife.06620
- Egea-Cortines, M., Saedler, H., and Sommer, H. (1999). Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. *EMBO J.* 18, 5370–9.
- El Kayal, W., Allen, C. C., Ju, C. J., Adams, E., King-Jones, S., Zaharia, L. I., et al. (2011). Molecular events of apical bud formation in white spruce, *Picea glauca*. *Plant Cell Environ.* 34, 480–500. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02257.x
- Fan, C.-M., Wang, X., Wang, Y.-W., Hu, R.-B., Zhang, X.-M., Chen, J.-X., et al. (2013). Genome-wide expression analysis of soybean MADS genes showing potential function in the seed development. *PLoS ONE* 8:e62288. doi: 10.1371/journal.pone.0062288
- Fan, S., Bielenberg, D. G., Zhebentyayeva, T. N., Reighard, G. L., Okie, W. R., Holland, D., et al. (2010). Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*). *New Phytol.* 185, 917–930. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03119.x
- Fang, S.-C., and Fernandez, D. E. (2002). Effect of regulated overexpression of the MADS domain factor AGL15 on flower senescence and fruit maturation. *Plant Physiol.* 130, 78–89. doi: 10.1104/pp.004721
- Faure, S., Higgins, J., Turner, A., and Laurie, D. A. (2007). The FLOWERING LOCUS T-Like gene family in barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics* 176, 599–609. doi: 10.1534/genetics.106.069500
- Fernandez, D. E., Heck, G. R., Perry, S. E., Patterson, S. E., Bleecker, A. B., and Fang, S. C. (2000). The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically. Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* 12, 183–98. doi: 10.1105/tpc.12.2.183
- Finnegan, E. J., and Dennis, E. S. (2007). Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr. Biol.* 17, 1978–83. doi: 10.1016/j.cub.2007.10.026
- Folsom, J. J., Begcy, K., Hao, X., Wang, D., and Walia, H. (2014). Rice fertilization-independent endosperm1 regulates seed size under heat stress by controlling early endosperm development. *Plant Physiol.* 165, 238–248. doi: 10.1104/pp.113.232413
- Franks, S. J. (2011). Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*. *New Phytol.* 190, 249–257. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03603.x
- Franks, S. J., Sim, S., and Weis, A. E. (2007). Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1278–1282. doi: 10.1073/pnas.0608379104
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124, 509–525. doi: 10.1007/s10265-011-0412-3
- Gan, Y., Bernreiter, A., Filleur, S., Abram, B., and Forde, B. G. (2012). Overexpressing the ANR1 MADS-box gene in transgenic plants provides new insights into its role in the nitrate regulation of root development. *Plant Cell Physiol.* 53, 1003–1016. doi: 10.1093/pcp/pcp050
- Garay-Arroyo, A., Ortiz-Moreno, E., de la Paz Sánchez, M., Murphy, A. S., García-Ponce, B., Marsch-Martínez, N., et al. (2013). The MADS transcription factor XAL2/AGL14 modulates auxin transport during Arabidopsis root development by regulating PIN expression. *EMBO J.* 32, 2884–2895. doi: 10.1038/emboj.2013.216
- Gilmour, S. J., Fowler, S. G., and Thomashow, M. F. (2004). Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol. Biol.* 54, 767–781. doi: 10.1023/B:PLAN.0000040902.06881.44
- Goto, K., and Meyerowitz, E. M. (1994). Function and regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes Dev.* 8, 1548–1560. doi: 10.1101/gad.8.13.1548
- Gramzow, L., Ritz, M. S., and Theissen, G. (2010). On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends Genet.* 26, 149–153. doi: 10.1016/j.tig.2010.01.004
- Greenup, A. G., Sasani, S., Oliver, S. N., Talbot, M. J., Dennis, E. S., Hemming, M. N., et al. (2010). ODDSOC2 is a MADS box floral repressor that is down-regulated by vernalization in temperate cereals. *Plant Physiol.* 153, 1062–1073. doi: 10.1104/pp.109.152488
- Gruber, B. D., Giehl, R. F. H., Friedel, S., and von Wiren, N. (2013). Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 163, 161–179. doi: 10.1104/pp.113.218453
- Gruszka, D. (2018). Crosstalk of the brassinosteroid signalosome with phytohormonal and stress signaling components maintains a balance between the processes of growth and stress tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* 19:2675. doi: 10.3390/ijms19092675
- Guo, X., Chen, G., Cui, B., Gao, Q., Guo, J.-E., Li, A., et al. (2016). Solanum lycopersicum agamous-like MADS-box protein AGL15-like gene, SIMBP11, confers salt stress tolerance. *Mol. Breed.* 36:125. doi: 10.1007/s11032-016-0544-1
- Han, Y., Chen, Z., Lv, S., Ning, K., Ji, X., Liu, X., et al. (2016). MADS-box genes and gibberellins regulate bolting in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Front. Plant Sci.* 7:1889. doi: 10.3389/fpls.2016.01889
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., and Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* 7, 1456–1466. doi: 10.4161/psb.21949
- Hedley, P. E., Russell, J. R., Jorgensen, L., Gordon, S., Morris, J. A., Hackett, C. A., et al. (2010). Candidate genes associated with bud dormancy release in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *BMC Plant Biol.* 10:202. doi: 10.1186/1471-2229-10-202
- Hemming, M. N., and Trevisan, B. (2011). Make hay when the sun shines: the role of MADS-box genes in temperature-dependent seasonal flowering responses. *Plant Sci.* 180, 447–453. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.12.001
- Hepworth, J., and Dean, C. (2015). Flowering Locus C's lessons: conserved chromatin switches underpinning developmental timing and adaptation. *Plant Physiol.* 168, 1237–1245. doi: 10.1104/pp.15.00496
- Hernández-Hernández, T., Martínez-Castilla, L. P., and Alvarez-Buylla, E. R. (2007). Functional diversification of B MADS-box homeotic regulators of flower development: adaptive evolution in protein-protein interaction domains after major gene duplication events. *Mol. Biol. Evol.* 24, 465–481. doi: 10.1093/molbev/msl182
- Hill, K., Wang, H., and Perry, S. E. (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant J.* 53, 172–185. doi: 10.1111/j.1365-3113.2007.03336.x
- Hoekstra, H. E., and Coyne, J. A. (2007). The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation. *Evolution* 61, 995–1016. doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00105.x
- Hoenicka, H., Nowitzki, O., Hanelt, D., and Fladung, M. (2008). Heterologous overexpression of the birch FRUITFULL-like MADS-box gene BpMADS4 prevents normal senescence and winter dormancy in *Populus tremula* L. *Planta* 227, 1001–11. doi: 10.1007/s00425-007-0674-0
- Honma, T., and Goto, K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 409, 525–529. doi: 10.1038/35054083
- Horvath, D. P., Anderson, J. V., Chao, W. S., and Foley, M. E. (2003). Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 8, 534–40. doi: 10.1016/j.tplants.2003.09.013
- Horvath, D. P., Chao, W. S., Suttle, J. C., Thimmapuram, J., and Anderson, J. V. (2008). Transcriptome analysis identifies novel responses and potential regulatory genes involved in seasonal dormancy transitions of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *BMC Genomics* 9:536. doi: 10.1186/1471-2164-9-536
- Horvath, D. P., Sung, S., Kim, D., Chao, W., and Anderson, J. V. (2010). Characterization, expression and function of DORMANCY ASSOCIATED MADS-BOX genes from leafy spurge. *Plant Mol. Biol.* 73, 169–179. doi: 10.1007/s11103-009-9596-5
- Hu, L., Liang, W., Yin, C., Cui, X., Zong, J., Wang, X., et al. (2011). Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. *Plant Cell* 23, 515–533. doi: 10.1105/tpc.110.074369

- Huang, H., Tudor, M., Su, T., Zhang, Y., Hu, Y., and Ma, H. (1996). DNA binding properties of two arabidopsis MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell* 8, 81–94. doi: 10.1105/tpc.8.1.81
- Immink, R. G. H., Tonaco, I. A. N., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A. D., Busscher-Lange, J., et al. (2009). SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol.* 10:R24. doi: 10.1186/gb-2009-10-2-r24
- Jack, T., Fox, G. L., and Meyerowitz, E. M. (1994). Arabidopsis homeotic gene APETALA3 ectopic expression: Transcriptional and posttranscriptional regulation determine floral organ identity. *Cell* 76, 703–716. doi: 10.1016/0092-8674(94)90509-6
- Janiak, A., Kwasniewski, M., and Szarejko, I. (2016). Gene expression regulation in roots under drought. *J. Exp. Bot.* 67, 1003–1014. doi: 10.1093/jxb/erv512
- Jarvis, E. E., Clark, K. L., and Sprague, G. F. (1989). The yeast transcription activator PRTE a homolog of the mammalian serum response factor, is encoded by the MCM1 gene. *Genes Dev.* 3, 936–945. doi: 10.1101/gad.3.7.936
- Jeon, J., and Kim, J. (2013). Cold stress signaling networks in Arabidopsis. *J. Plant Biol.* 56, 69–76. doi: 10.1007/s12374-013-0903-y
- Jiménez, S., Lawton-Rauh, A. L., Reighard, G. L., Abbott, A. G., and Bielenberg, D. G. (2009). Phylogenetic analysis and molecular evolution of the dormancy associated MADS-box genes from peach. *BMC Plant Biol.* 9:81. doi: 10.1186/1471-2229-9-81
- Jogaiah, S., Govind, S. R., and Tran, L.-S. P. (2013). Systems biology-based approaches toward understanding drought tolerance in food crops. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33, 23–39. doi: 10.3109/07388551.2012.659174
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R. M., and Dean, C. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in arabidopsis flowering time. *Science* 290, 344–347. doi: 10.1126/science.290.5490.344
- Jurkiewicz, P., and Batoko, H. (2018). Protein degradation mechanisms modulate abscisic acid signaling and responses during abiotic stress. *Plant Sci.* 267, 48–54. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.10.017
- Kasuga, M., Miura, S., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol.* 45, 346–350. doi: 10.1093/pcp/pch037
- 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. doi: 10.1016/j.gene.2004.12.014
- Kaufmann, K., Muñoz, J. M., Jauregui, R., Airolidi, C. A., Smaczniak, C., Krajewski, P., et al. (2009). Target genes of the MADS transcription factor sepallata3: Integration of developmental and hormonal pathways in the arabidopsis flower. *PLoS Biol.* 7, 0854–0875. doi: 10.1371/journal.pbio.1000090
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muñoz, J. M., Ferrier, T., Wuest, S. E., Kumar, V., et al. (2010). Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science* 328, 85–89. doi: 10.1126/science.1185244
- Kazan, K., and Lyons, R. (2016). The link between flowering time and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 67, 47–60. doi: 10.1093/jxb/erv441
- Khong, G. N., Pati, P. K., Richaud, F., Parizot, B., Bidzinski, P., Mai, C. D., et al. (2015). OsMADS26 negatively regulates resistance to pathogens and drought tolerance in rice. *Plant Physiol.* 169, 2935–49. doi: 10.1104/pp.15.01192
- Kim, S. Y., Hong, C. B., and Lee, I. (2001). Heat shock stress causes stage-specific male sterility in arabidopsis thaliana. *J. Plant Res.* 114, 301–307. doi: 10.1007/PL00013991
- King, R. W., Moritz, T., Evans, L. T., Martin, J., Andersen, C. H., Blundell, C., et al. (2006). Regulation of flowering in the long-day grass *lolium temulentum* by gibberellins and the FLOWERING LOCUS T gene. *Plant Physiol.* 141, 498–507. doi: 10.1104/pp.106.076760
- Kramer, E. M., Dorit, R. L., and Irish, V. F. (1998). Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: Duplication and divergence within the APETALA3 and PISTILLATA MADS-box gene lineages. *Genetics* 149, 765–783.
- Lee, H., Suh, S. S., Park, E., Cho, E., Ahn, J. H., Kim, S. G., et al. (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes Dev.* 14, 2366–2376. doi: 10.1101/gad.813600
- Lee, J. H., Ryu, H.-S., Chung, K. S., Pose, D., Kim, S., Schmid, M., et al. (2013). Regulation of temperature-responsive flowering by MADS-box transcription factor repressors. *Science* 342, 628–632. doi: 10.1126/science.1241097
- Lee, J. H., Yoo, S. J., Park, S. H., Hwang, I., Lee, J. S., and Ahn, J. H. (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes Dev.* 21, 397–402. doi: 10.1101/gad.1518407
- Lee, S., Woo, Y.-M., Ryu, S.-I., Shin, Y.-D., Kim, W. T., Park, K. Y., et al. (2008). Further characterization of a rice AGL12 group MADS-box gene, OsMADS26. *Plant Physiol.* 147, 156–68. doi: 10.1104/pp.107.114256
- Leseberg, C. H., Li, A., Kang, H., Duvall, M., and Mao, L. (2006). Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Populus trichocarpa*. *Gene* 378, 84–94. doi: 10.1016/j.gene.2006.05.022
- Levitt, J. (1985). Responses of plants to environmental stresses. *J. Range Manag.* 38:480.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., et al. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev. Cell* 15, 110–120. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.002
- Lionakis, S. M., and Schwabe, W. W. (1984). Bud dormancy in the Kiwi fruit, *Actinidia chinensis* Planch. *Ann. Bot.* 54, 467–484.
- Liu, B., Zhang, N., Wen, Y., Jin, X., Yang, J., Si, H., et al. (2015). Transcriptomic changes during tuber dormancy release process revealed by RNA sequencing in potato. *J. Biotechnol.* 198, 17–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.019
- Liu, J., Xu, B., Hu, L., Li, M., Su, W., Wu, J., et al. (2009). Involvement of a banana MADS-box transcription factor gene in ethylene-induced fruit ripening. *Plant Cell Rep.* 28, 103–111. doi: 10.1007/s00299-008-0613-y
- Lozano, R., Angosto, T., Gómez, P., Payán, C., Capel, J., Huijser, P., et al. (1998). Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of MADS-Box genes. *Plant Physiol.* 117, 91–100. doi: 10.1104/pp.117.1.91
- Ludlow, M. M. (1980). Stress physiology of tropical pasture plants. *Trop. Grasslands* 14, 136–145.
- Lutz, U., Nussbaumer, T., Spannagl, M., Diener, J., Mayer, K. F., and Schwechheimer, C. (2017). Natural haplotypes of FLM non-coding sequences fine-tune flowering time in ambient spring temperatures in Arabidopsis. *Elife* 6:e22114. doi: 10.7554/eLife.22114
- Ma, X., Sukiran, N., Ma, H., and Su, Z. (2014). Moderate drought causes dramatic floral transcriptomic reprogramming to ensure successful reproductive development in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 14:164. doi: 10.1186/1471-2229-14-164
- Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Phan Tran, L.-S., and Nguyen, H. T. (2009). Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiol.* 50, 1260–1276. doi: 10.1093/pcp/pcp082
- Maurino, V. G., and Flugge, U.-I. (2008). Experimental systems to assess the effects of reactive oxygen species in plant tissues. *Plant Signal. Behav.* 3, 923–928. doi: 10.4161/psb.7036
- Mazzitelli, L., Hancock, R. D., Haupt, S., Walker, P. G., Pont, S. D. A., McNicol, J., et al. (2007). Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. *J. Exp. Bot.* 58, 1035–1045. doi: 10.1093/jxb/erl266
- Melzer, R. (2017). Regulation of flowering time: a splicy business. *J. Exp. Bot.* 68, 5017–5020. doi: 10.1093/jxb/erx353
- Melzer, R., and Theißen, G. (2009). Reconstitution of 'floral quartets' *in vitro* involving class B and class E floral homeotic proteins. *Nucleic Acids Res.* 37, 2723–2736. doi: 10.1093/nar/gkp129
- Messenguy, F., and Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316, 1–21. doi: 10.1016/S0378-1119(03)00747-9
- 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. doi: 10.1105/tpc.11.5.949
- Michaels, S. D., and Amasino, R. M. (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* 13, 935–941. doi: 10.2307/3871350
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498. doi: 10.1016/j.tplants.2004.08.009
- Mizukami, Y., Huang, H., Tudor, M., Hu, Y., and Ma, H. (1996). Functional domains of the floral regulator AGAMOUS: characterization of the DNA

- binding domain and analysis of dominant negative mutations. *Plant Cell* 8, 831–45.
- Moon, J., Lee, H., Kim, M., and Lee, I. (2005). Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 46, 292–299. doi: 10.1093/pcp/pci024
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C. B., Paek, N.-C., et al. (2003). The SOCI MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 35, 613–623. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01833.x
- Müller, F., Xu, J., Kristensen, L., Wolters-Arts, M., de Groot, P. F. M., Jansma, S. Y., et al. (2016). High-temperature-induced defects in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther and pollen development are associated with reduced expression of B-class floral patterning genes. *PLoS ONE* 11:e0167614. doi: 10.1371/journal.pone.0167614
- Nadal, E. d., Casadome, L., and Posas, F. (2003). Targeting the MEF2-like transcription factor Smpl by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 23, 229–237. doi: 10.1128/MCB.23.1.229-237.2003
- Nakashima, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Rep.* 32, 959–970. doi: 10.1007/s00299-013-1418-1
- Nelson, D. E., Repetti, P. P., Adams, T. R., Creelman, R. A., Wu, J., Warner, D. C., et al. (2007). Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 16450–16455. doi: 10.1073/pnas.0707193104
- Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., and Treisman, R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55, 989–1003.
- Onouchi, H., Igeño, M. I., Périlleux, 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. doi: 10.1105/tpc.12.6.885
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Front. Plant Sci.* 5:86. doi: 10.3389/fpls.2014.00086
- Parenicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., et al. (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15, 1538–1551. doi: 10.1105/tpc.011544
- Passmore, S., Maine, G. T., Elble, R., Christ, C., and Tye, B.-K. (1988). Saccharomyces cerevisiae protein involved in plasmid maintenance is necessary for mating of MAT α cells. *J. Mol. Biol.* 204, 593–606.
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405, 200–203. doi: 10.1038/35012103
- Pelaz, S., Gustafson-Brown, C., Kohalmi, S. E., Crosby, W. L., and Yanofsky, M. F. (2001). APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. *Plant J.* 26, 385–394. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2001.2641042.x
- Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G. C., et al. (2013). Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature* 503, 414–417. doi: 10.1038/nature12633
- Price, A. H., and Hendry, G. A. F. (1991). Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ.* 14, 477–484.
- Ratcliffe, O. J., Kumimoto, R. W., Wong, B. J., and Riechmann, J. L. (2003). Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell* 15, 1159–69. doi: 10.1105/tpc.009506
- Ratcliffe, O. J., Nádzan, G. C., Reuber, T. L., and Riechmann, J. L. (2001). Regulation of flowering in Arabidopsis by an FLC homologue. *Plant Physiol.* 126, 122–32. doi: 10.1104/pp.126.1.122
- Rellán-Álvarez, R., Lobet, G., and Dinnyen, J. R. (2016). Environmental control of root system biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 619–642. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111848
- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C., and Conti, L. (2013). GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *Plant Physiol.* 162, 1706–1719. doi: 10.1104/pp.113.217729
- Riboni, M., Test, A. R., Galbiati, M., Tonelli, C., and Conti, L. (2016). ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 67, 6309–6322. doi: 10.1093/jxb/erw384
- Riechmann, J. L., Wang, M., and Meyerowitz, E. M. (1996). DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Res.* 24, 3134–41.
- Ríos, G., Leida, C., Conejero, A., and Badenes, M. L. (2014). Epigenetic regulation of bud dormancy events in perennial plants. *Front. Plant Sci.* 5:247. doi: 10.3389/fpls.2014.00247
- Rodriguez-A, J., Sherman, W. B., Scorza, R., Wisniewski, M., and Okie, W. R. (1994). 'Evergreen' peach, its inheritance and dormant behavior. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119, 789–792.
- Rohde, A., and Bhalerao, R. P. (2007). Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci.* 12, 217–223. doi: 10.1016/j.tplants.2007.03.012
- Rohde, A., Storme, V., Jorge, V., Gaudet, M., Vitacolonna, N., Fabbri, F., et al. (2011). Bud set in poplar - genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. *New Phytol.* 189, 106–121. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03469.x
- Romeu, J. F., Monforte, A. J., Sánchez, G., Granell, A., García-Brunton, J., Badenes, M. L., et al. (2014). Quantitative trait loci affecting reproductive phenology in peach. *BMC Plant Biol.* 14:52. doi: 10.1186/1471-2229-14-52
- Rounsley, S. D., Ditta, G. S., and Yanofsky, M. F. (1995). Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. *Plant Cell* 7:1259. doi: 10.2307/3870100
- Rouse, D. T., Sheldon, C. C., Bagnall, D. J., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (2002). FLC, a repressor of flowering, is regulated by genes in different inductive pathways. *Plant J.* 29, 183–191. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01210.x
- Ruelens, P., De Maagd, R. A., Proost, S., Theißen, G., Geuten, K., and Kaufmann, K. (2013). FLOWERING LOCUS C in monocots and the tandem origin of angiosperm-specific MADS-box genes. *Nat. Commun.* 4:2280. doi: 10.1038/ncomms3280
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., et al. (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* 19, 2370–2390. doi: 10.1105/tpc.107.052811
- Sablowski, R. (2010). Genes and functions controlled by floral organ identity genes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 94–99. doi: 10.1016/j.semdb.2009.08.008
- Saito, T. T., Bai, S., Ito, A., Sakamoto, D., Saito, T. T., Ubi, B. E., et al. (2013). Expression and genomic structure of the dormancy-associated MADS box genes MADS13 in Japanese pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) that differ in their chilling requirement for endodormancy release. *Tree Physiol.* 33, 654–667. doi: 10.1093/treephys/tp037
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18822–18827. doi: 10.1073/pnas.0605639103
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., et al. (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* 288, 1613–1616. doi: 10.1126/science.288.5471.1613
- Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., and Martínez-Gómez, P. (2012). Inheritance of chilling and heat requirements for flowering in almond and QTL analysis. *Tree Genet. Genomes* 8, 379–389. doi: 10.1007/s11295-011-0448-5
- Sarvepalli, K., Das Gupta, M., Challa, K. R., and Nath, U. (2019). Molecular cartography of leaf development-role of transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 47, 22–31. doi: 10.1016/j.pbi.2018.08.002
- Sasaki, R., Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Kitamura, Y., Akagi, T., et al. (2011). Functional and expression analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot. *Plant Physiol.* 157, 485–497. doi: 10.1104/pp.111.181982
- Sasani, S., Hemming, M. N., Oliver, S. N., Greenup, A., Tavakkol-Afshari, R., Mahfooz, S., et al. (2009). The influence of vernalization and daylength on expression of flowering-time genes in the shoot apex and leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *J. Exp. Bot.* 60, 2169–78. doi: 10.1093/jxb/erp098
- Schippers, J. H., Foyer, C. H., and van Dongen, J. T. (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 29, 121–128. doi: 10.1016/j.pbi.2015.11.009

- Schlesinger, J., Schueler, M., Grunert, M., Fischer, J. J., Zhang, Q., Krueger, T., et al. (2011). The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs. *PLoS Genet.* 7:e1001313. doi: 10.1371/journal.pgen.1001313
- Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P. J., Hansen, R., Tetens, F., et al. (1992). Characterization of the Antirrhinum floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J.* 11, 251–263. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05048.x
- 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.
- Scortecci, K., Michaels, S. D., and Amasino, R. M. (2003). Genetic interactions between FLM and other flowering-time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 52, 915–922. doi: 10.1023/A:1025426920923
- Scortecci, K. C., Michaels, S. D., and Amasino, R. M. (2001). Identification of a MADS-box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. *Plant J.* 26, 229–236. doi: 10.1046/j.1365-3113x.2001.01024.x
- Seo, E., Lee, H., Jeon, J., Park, H., Kim, J., Noh, Y.-S., et al. (2009). Crosstalk between Cold Response and Flowering in *Arabidopsis* Is Mediated through the Flowering-Time Gene *SOC1* and Its Upstream Negative Regulator *FLC*. *Plant Cell* 21, 3185–3197. doi: 10.1105/tpc.108.063883
- Shahzad, Z., and Amtmann, A. (2017). Food for thought: how nutrients regulate root system architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39, 80–87. doi: 10.1016/j.pbi.2017.06.008
- Sheldon, C. C., Burn, J. E., Perez, P. P., Metzger, J., Edwards, J. A., Peacock, W. J., et al. (1999). The FLM MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* 11, 445–458.
- Sheldon, C. C., Finnegan, E. J., Rouse, D. T., Tadege, M., Bagnall, D. J., Helliwell, C. A., et al. (2000). The control of flowering by vernalization. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 418–422. doi: 10.1016/S1369-5266(00)0106-0
- Shi, S.-y., Zhang, F.-f., Gao, S., and Xiao, K. (2016). Expression pattern and function analyses of the MADS transcription factor genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) under phosphorus-starvation condition. *J. Integr. Agric.* 15, 1703–1715. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61167-4
- Shu, K., Liu, X. D., Xie, Q., and He, Z. H. (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol. Plant* 9, 34–45. doi: 10.1016/j.molp.2015.08.010
- Singh, R. K., Maurya, J. P., Azeez, A., Miskolczi, P., Tylewicz, S., Stojković, K., et al. (2018). A genetic network mediating the control of bud break in hybrid aspen. *Nat. Commun.* 9:4173. doi: 10.1038/s41467-018-06696-y
- Singh, R. K., Miskolczi, P., Maurya, J. P., and Bhalerao, R. P. (2019). A tree ortholog of short vegetative phase floral repressor mediates photoperiodic control of bud dormancy. *Curr. Biol.* 29, 128–133.e2. doi: 10.1016/j.cub.2018.11.006
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Angenent, G. C., and Kaufmann, K. (2012a). Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139, 3081–3098. doi: 10.1242/dev.074674
- Smaczniak, C., Immink, R. G. H., Muiño, J. M., Blanvillain, R., Busscher, M., Busscher-Lange, J., et al. (2012b). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1560–5. doi: 10.1073/pnas.1112871109
- Snelgar, W. P., Clearwater, M. J., and Walton, E. F. (2007). Flowering of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) is reduced by long photoperiods. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 35, 33–38. doi: 10.1080/01140670709510165
- Sommer, H., Beltrán, J. P., Huijser, P., Pape, H., Lönig, W. E., Saedler, H., et al. (1990). *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 9, 605–613. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08152.x
- Sridhar, V. V., Surendrao, A., and Liu, Z. (2006). APETALA1 and SEPALLATA3 interact with SEUSS to mediate transcription repression during flower development. *Development* 133, 3159–3166. doi: 10.1242/dev.02498
- Srikanth, A., and Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2013–2037. doi: 10.1007/s00018-011-0673-y
- Su, Z., Ma, X., Guo, H., Sukiran, N. L., Guo, B., Assmann, S. M., et al. (2013). Flower development under drought stress: morphological and transcriptomic analyses reveal acute responses and long-term acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 3785–3807. doi: 10.1105/tpc.113.115428
- Sullivan, A. L., Benner, C., Heinz, S., Huang, W., Xie, L., Miano, J. M., et al. (2011). Serum response factor utilizes distinct promoter- and enhancer-based mechanisms to regulate cytoskeletal gene expression in macrophages. *Mol. Cell Biol.* 31, 861–875. doi: 10.1128/MCB.00836-10
- Sung, S., and Amasino, R. M. (2005). Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 491–508. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144307
- Sureshkumar, S., Dent, C., Seleznev, A., Tasset, C., and Balasubramanian, S. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay modulates FLM-dependent thermosensory flowering response in *Arabidopsis*. *Nat. Plants* 2:16055. doi: 10.1038/nplants.2016.55
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., et al. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* 39, 792–796. doi: 10.1038/ng2041
- Tapia-Lopez, R., Garcia-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Perez-Ruiz, R. V., Kim, S.-H., et al. (2008). An AGAMOUS-Related MADS-Box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146, 1182–1192. doi: 10.1104/pp.107.108647
- Thangavel, G., and Nayar, S. (2018). A survey of MIKC type MADS-Box genes in non-seed plants: algae, bryophytes, lycophytes and ferns. *Front. Plant Sci.* 9:5313–5328. doi: 10.3389/fpls.2018.00510
- Theissen, G., Kim, J. T., and Saedler, H. (1996). Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 43, 484–516.
- Theissen, G., Rümpler, F., and Gramzow, L. (2018). Array of MADS-box genes: facilitator for rapid adaptation? *Trends Plant Sci.* 23, 563–576. doi: 10.1016/j.tplants.2018.04.008
- Theissen, G., and Saedler, H. (2001). Floral quartets. *Nature* 409, 469–471. doi: 10.1038/35054172
- Trainin, T., Bar-Yakov, I., and Holland, D. (2013). ParSOC1, a MADS-box gene closely related to *Arabidopsis* AGL20/SOC1, is expressed in apricot leaves in a diurnal manner and is linked with chilling requirements for dormancy break. *Tree Genet. Genomes* 9, 753–766. doi: 10.1007/s11295-012-0590-8
- Trevaskis, B., Bagnall, D. J., Ellis, M. H., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (2003). MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13099–13104. doi: 10.1073/pnas.1635053100
- Tröbner, W., Ramirez, L., Schwarz-Sommer, Z., Saedler, H., Sommer, H., Hue, I., et al. (2018). GLOBOSA: a homeotic gene which interacts with DEFICIENS in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *EMBO J.* 11, 4693–4704. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05574.x
- Tsukagoshi, H., Busch, W., and Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143, 606–616. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.020
- Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R. P., and Laurie, D. A. (2005). The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310, 1031–1034. doi: 10.1126/science.1117619
- Ubi, B., Sakamoto, D., Ban, Y., Shimada, T., Ito, a., Nakajima, I., et al. (2010). Molecular cloning of dormancy-associated MADS-box gene homologs and their characterization during seasonal endodormancy transitional phases of Japanese pear. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 174–182. doi: 10.21273/JASHS.135.2.174
- Verelst, W., Twell, D., de Folter, S., Immink, R., Saedler, H., and Münster, T. (2007). MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biol.* 8:R249. doi: 10.1186/gb-2007-8-11-r249
- Vidal, E. A., Araus, V., Lu, C., Parry, G., Green, P. J., Coruzzi, G. M., et al. (2010). Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4477–4482. doi: 10.1073/pnas.0909571107
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., et al. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Front. Plant Sci.* 8:161. doi: 10.3389/fpls.2017.00161

- Wang, D.-Z., Jin, Y.-N., Ding, X.-H., Wang, W.-J., Zhai, S.-S., Bai, L.-P., et al. (2017). Gene regulation and signal transduction in the ICE-CBF-COR signaling pathway during cold stress in plants. *Biochem* 82, 1103–1117. doi: 10.1134/S0006297917100030
- Wang, R., Farrona, S., Vincent, C., Joecker, A., Schoof, H., Turck, F., et al. (2009). PEP1 regulates perennial flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 459, 423–427. doi: 10.1038/nature07988
- Wang, Z., Wang, F., Hong, Y., Yao, J., Ren, Z., Shi, H., et al. (2018). The flowering repressor SVP confers drought resistance in *Arabidopsis* by regulating abscisic acid catabolism. *Mol. Plant* 11, 1184–1197. doi: 10.1016/j.molp.2018.06.009
- Welch, D., Hassan, H., Bilou, I., Immink, R., Heidstra, R., and Scheres, B. (2007). *Arabidopsis* JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes Dev.* 21, 2196–2204. doi: 10.1101/gad.440307
- Whittaker, C., and Dean, C. (2017). The FLC Locus: a platform for discoveries in epigenetics and adaptation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 555–575. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060546
- Wils, C. R., and Kaufmann, K. (2017). Gene-regulatory networks controlling inflorescence and flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1860, 95–105. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.07.014
- Wollenberg, A. C., and Amasino, R. M. (2012). Natural variation in the temperature range permissive for vernalization in accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 35, 2181–2191. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02548.x
- Wu, R., Tomes, S., Karunaratnam, S., Tustin, S. D., Hellens, R. P., Allan, A. C., et al. (2017a). SVP-like MADS box genes control dormancy and budbreak in apple. *Front. Plant Sci.* 8, 403–411. doi: 10.3389/fpls.2017.00477
- Wu, R., Wang, T., Warren, B. A., Allan, A. C., Macknight, R. C., and Varkonyi-Gasic, E. (2017b). Kiwifruit SVP2 gene prevents premature budbreak during dormancy. *J. Exp. Bot.* 68, 1071–1082. doi: 10.1093/jxb/erx014
- Wu, R. M., Walton, E. F., Richardson, A. C., Wood, M., Hellens, R. P., and Varkonyi-Gasic, E. (2012). Conservation and divergence of four kiwifruit SVP-like MADS-box genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering. *J. Exp. Bot.* 63, 797–807. doi: 10.1093/jxb/err304
- Xu, J. L., Lafitte, H. R., Gao, Y. M., Fu, B. Y., Torres, R., and Li, Z. K. (2005). QTLs for drought escape and tolerance identified in a set of random introgression lines of rice. *Theor. Appl. Genet.* 111, 1642–1650. doi: 10.1007/s00122-005-0099-8
- Yamaguchi, T., Lee, D. Y., Miyao, A., Hirochika, H., An, G., and Hirano, H.-Y. (2006). Functional diversification of the two C-class MADS box genes OSMADS3 and OSMADS58 in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 18, 15–28. doi: 10.1105/tpc.105.037200
- Yamane, H., Kashiwa, Y., Ooka, T., Tao, R., and Yonemori, K. (2008). Suppression subtractive hybridization and differential screening reveals endodormancy-associated expression of an SVP/AGL24-type MADS-box gene in lateral vegetative buds of Japanese apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133, 708–716. doi: 10.21273/JASHS.133.5.708
- Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Hosaka, Y., Sasaki, R., and Tao, R. (2011). Expressional regulation of PpDAMS and PpDAM6, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *J. Exp. Bot.* 62, 3481–3488. doi: 10.1093/jxb/err028
- Yan, L., Fu, D., Li, C., Blechl, A., Tranquilli, G., Bonafede, M., et al. (2006). The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19581–19586. doi: 10.1073/pnas.0607142103
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., and Dubcovsky, J. (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6263–6268. doi: 10.1073/pnas.0937399100
- Yan, W., Chen, D., and Kaufmann, K. (2016). Molecular mechanisms of floral organ specification by MADS domain proteins. *Curr. Opin. Plant Biol.* 29, 154–162. doi: 10.1016/j.pbi.2015.12.004
- Yang, F., Xu, F., Wang, X., Liao, Y., Chen, Q., and Meng, X. (2016). Characterization and functional analysis of a MADS-box transcription factor gene (GbmADS9) from *Ginkgo biloba*. *Sci. Hortic.* 212, 104–114. doi: 10.1016/j.scienta.2016.09.042
- Yang, H., Howard, M., and Dean, C. (2014). Antagonistic roles for H3K36me3 and H3K27me3 in the cold-induced epigenetic switch at *Arabidopsis* FLC. *Curr. Biol.* 24, 1793–1797. doi: 10.1016/j.cub.2014.06.047
- Yanofsky, M. F., Ma, H., Bowman, J. L., Drews, G. N., Feldmann, K. A., and Meyerowitz, E. M. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature* 346, 35–39. doi: 10.1038/346035a0
- Yin, W., Hu, Z., Cui, B., Guo, X., Hu, J., Zhu, Z., et al. (2017). Suppression of the MADS-box gene SIMBP8 accelerates fruit ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Physiol. Biochem.* 118, 235–244. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.06.019
- Yoshida, T., Mogami, J., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014a). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 133–139. doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.009
- Yoshida, T., Mogami, J., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014b). Omics approaches toward defining the comprehensive abscisic acid signaling network in plants. *Plant Cell Physiol.* 56, 1043–1052. doi: 10.1093/pcp/pcv060
- Yu, C. C., Su, S., Xu, Y., Zhao, Y., Yan, A., Huang, L., et al. (2014). The effects of fluctuations in the nutrient supply on the expression of five members of the AGL17 clade of MADS-box genes in Rice. *PLoS ONE* 9:e105597. doi: 10.1371/journal.pone.0105597
- Yu, C., Liu, Y., Zhang, A., Su, S., Yan, A., Huang, L., et al. (2015). MADS-box transcription factor OsMADS25 regulates root development through affection of nitrate accumulation in rice. *PLoS ONE* 10:e0135196. doi: 10.1371/journal.pone.0135196
- Yu, L.-H., Miao, Z.-Q., Qi, G.-F., Wu, J., Cai, X.-T., Mao, J.-L., et al. (2014). MADS-box transcription factor AGL21 regulates lateral root development and responds to multiple external and physiological signals. *Mol. Plant* 7, 1653–1669. doi: 10.1093/mp/ssu088
- Yu, L. H., Wu, J., Zhang, Z. S., Miao, Z. Q., Zhao, P. X., Wang, Z., et al. (2017). *Arabidopsis* MADS-box transcription factor AGL21 acts as environmental surveillance of seed germination by regulating ABI5 expression. *Mol. Plant* 10, 834–845. doi: 10.1016/j.molp.2017.04.004
- Zahn, L. M., Leebens-Mack, J. H., Arrington, J. M., Hu, Y., Landherr, L. L., DePamphilis, C. W., et al. (2006). Conservation and divergence in the AGAMOUS subfamily of MADS-box genes: evidence of independent sub- and neofunctionalization events. *Evol. Dev.* 8, 30–45. doi: 10.1111/j.1525-142X.2006.05073.x
- Zeng, J., Dong, Z., Wu, H., Tian, Z., and Zhao, Z. (2017). Redox regulation of plant stem cell fate. *EMBO J.* 36, 2844–2855. doi: 10.15252/embj.201695955
- Zhang, H., and Forde, B. G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279, 407–409.
- Zhang, H., Jennings, A., Barlow, P. W., and Forde, B. G. (1999). Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6529–6534.
- Zhebentayeva, T. N., Fan, S., Chandra, A., Bielenberg, D. G., Reighard, G. L., Okie, W. R., et al. (2014). Dissection of chilling requirement and bloom date QTLs in peach using a whole genome sequencing of sibling trees from an F2 mapping population. *Tree Genet. Genomes* 10, 35–51. doi: 10.1007/s11295-013-0660-6
- Zheng, Y., Ren, N., Wang, H., Stromberg, A. J., and Perry, S. E. (2009). Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *Plant Cell* 21, 2563–77. doi: 10.1105/tpc.109.068890
- Zhu, J.-K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167, 313–324. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.029

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Castelán-Muñoz, Herrera, Cajero-Sánchez, Arrizubieta, Trejo, García-Ponce, Sánchez, Álvarez-Buylla and Garay-Arroyo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.