

**FUNCIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL DE TIPO
MADS-BOX, AGAMOUS-LIKE 67 (AGL67), EN LA
SEÑALIZACIÓN HORMONAL DURANTE LA
GERMINACIÓN DE
SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*.**



Marta Curto Prieto
Salamanca, 2013

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Fisiología Vegetal
CIALE
Facultad de Biología



**FUNCIÓN DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL DE TIPO
MADS-BOX, AGAMOUS-LIKE 67 (AGL67), EN LA
SEÑALIZACIÓN HORMONAL DURANTE LA
GERMINACIÓN DE
SEMILLAS DE *Arabidopsis thaliana*.**

Marta Curto Prieto
Salamanca, 2013

D^a. BERTA DOPICO RIVELA, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **“Función del factor transcripcional de tipo MADS-box, AGAMOUS-LIKE 67 (AGL67), en la señalización hormonal durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*”** ha sido realizada por la licenciada **D^a. Marta Curto Prieto** en el Departamento de Fisiología Vegetal de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Dres. D. Oscar Lorenzo Sánchez y D. Luis Sanz Andreu, y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 13 de Marzo de 2013.

Fdo: Dra. Dña. Berta Dopico Rivela.

D. OSCAR LORENZO SÁNCHEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y D. LUIS SANZ ANDREU, INVESTIGADOR POSTDOCTORAL CONTRATADO DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada **“Función del factor transcripcional de tipo MADS-box, AGAMOUS-LIKE 67 (AGL67), en la señalización hormonal durante la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana*”** ha sido realizada por la licenciada D^a. **Marta Curto Prieto** en el Departamento de Fisiología Vegetal y el Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección, y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Salamanca a 13 de Marzo de 2013.

Fdo:

Dr. D. Oscar Lorenzo Sánchez

Fdo:

Dr. D. Luis Sanz Andreu

Fdo:

El doctorando

FINANCIACIÓN Y ORGANISMOS IMPLICADOS

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral he disfrutado de un contrato de investigación con cargo al proyecto CONSOLIDER TRANSPLANTA. La realización de los experimentos llevados a cabo ha sido posible gracias a los siguientes proyectos de investigación:

- “TRANSPLANTA: Function and biotechnological potential of transcription factors in plants”. Ministerio de Educación y Ciencia, CONSOLIDER Programa 28317 (CSD2007-00057).
- Acción Integrada Hispano-Italiana. Ministerio de Ciencia e Innovación (IT2009-0041).
- “Molecular and Genetic Insights into Arabidopsis Nitric Oxide (NO) Signalling Pathway”. Ministerio de Ciencia e Innovación (BIO2011-26940).
- "Bases moleculares y genéticas de las respuestas a óxido nítrico (NO) en la germinación y el desarrollo de Arabidopsis". Junta de Castilla y León. (SAO48A10-2).



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



**Junta de
Castilla y León**

A mi madre

Agradecimientos

Ahora que ha llegado el final me gustaría dar las gracias a todos aquellos que han estado conmigo en esta etapa de mi vida.

En primer lugar a mis directores de Tesis, el Dr. Oscar Lorenzo y el Dr. Luis Sanz. Gracias Oscar, por darme la oportunidad de trabajar en el mundo de la investigación. Luis, muchas gracias también por todo lo que he aprendido a tu lado.

Gracias a ti también Lola, en primer lugar porque fuiste tú, con tu asignatura Biología Molecular de Plantas, la que despertaste en mí el interés hacia el mundo de la ciencia, gracias por tener siempre palabras amables, gracias por escucharme y gracias por preocuparte cada día por mí.

Gracias también al Profesor Gregorio Nicolás, por todo lo que ha hecho por el mundo de la Fisiología Vegetal.

A todos los miembros del laboratorio 7 del CIALE en el que he realizado mi trabajo: Lucho, Abe, Hasimah, Patricia, Pablo, Susana, Isabel, Inma, Natan, Jesús, Tamara, Noel, Noemí, Jorge y Juan.

Gracias también a Marlene y a Tomás, por escucharme, por preocuparos, por estar siempre ahí aunque no os lo pida, en fin, por ser mis amigos.

A mis compañeros del Máster y del CIALE por la ayuda prestada, por los buenos momentos (pinchos, hamburguesas, cafés...), porque parte de vosotros os habeis convertido en buenos amigos, Lucía, Ana María, Gaby, Esther (Pame y Marcos también, aunque no seáis del Máster directamente). Gracias Gaby (laboratorio 1) porque sin ti no hubiera hecho los árboles filogenéticos y gracias también a Abe (laboratorio 7) por hacer la primera parte del ensayo de doble híbrido en levadura. Un recuerdo muy especial para Anna, te deseo lo mejor en tu nueva vida en Luxemburgo.

Un millón de gracias a mis padres, por ellos soy lo que soy y estoy donde estoy. Gracias mamá porque aunque ya no estás conmigo te siento a mi lado en cada momento, gracias por tus consejos, por tu sonrisa, por tu risa contagiosa, por las sobremesas, por tus besos... Gracias por todo papá, porque te has comportado como un valiente, porque tienes que dar mucha guerra todavía y porque sí y punto.

Muchas gracias a mis abuelos, me hubiera gustado mucho que estuvierais conmigo en este momento, pero sé que estáis viéndome y ayudándome desde el rincón más bonito del cielo con mamá.

Muchísimas gracias también a ti, Ana, eres la mejor hermana que se puede tener, gracias por todo lo que he aprendido de ti en estos años y por lo que me queda. Eres un ejemplo a seguir, no cambies nunca. Gracias Javi, “cuñaaaaaaaaaaaaaaaaaao” por estar siempre dispuesto a echar una mano en todo. Como no, gracias a mis pequeñajos, Manuel, mil gracias por tus locuras, tu inocencia, tus risotadas, tus canciones, tus bailes, tus abrazos...Gracias también a mi pocholita, Vega, porque has dado una alegría enorme en casa, por las cosas que aprendes y que nos enseñas cada día, ¡que te como la cara!

Gracias a mis amigos, Chema, Marga, Jara, Juan Luis, Mari y Mónica por los buenos momentos que hemos vivido, cenas y meriendas en el ático de Chema, singstars, casas rurales... En fin, por todos esos momentos inolvidables.

Gracias también a mis amigas del pueblo, Marta, Sonia, María, Patri... aunque os vea poco se que estáis ahí cuando os necesito.

Muchas gracias Mariaje, Ángel, Mariaje (grande) y Lino porque siempre habéis estado a mi lado en los buenos y en los malos momentos. Gracias también a mis otros dos pequeñajos, Norah y Marco, porque con Manuel y Vega sois la alegría de la casa.

Gracias también a Maribel y Lorenzo porque me habéis tratado como un miembro más de la familia desde el primer día.

Como no, gracias Álex, por tu apoyo, por tu ayuda, por hacerme reír, por escucharme, por estar ahí...En fin, por todo lo que ya sabes, porque aquí estoy porque he venido, porque he venido aquí estoy, si no les gusta mi canto, como he venido me voy, jajaja.

En definitiva, mil gracias a todos los que me quieren.

A continuación se detallan las abreviaturas y siglas empleadas en la realización del presente trabajo. Los nombres de unidades y símbolos han sido utilizados según el Sistema Internacional de Unidades y las sustancias químicas se rigen según el sistema de nomenclatura de la IUPAC.

aa	aminoácidos	GAs	giberelinas
ABA	ácido abscísico	GA20ox	GA 20-oxidasa
abi	mutante insensible a ABA	GA3ox	GA 3-oxidasa
AD	dominio de activación de la proteína GAL4	GID1	gibberellin insensitive dwarf1
AGL	agamous like	GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
amiRNA	micro ácido ribonucleico artificial	GGDP	geranil-geranil difosfato
ATP	adenosina trifosfato	GUS	β-glucuronidasa
BD	dominio de unión a DNA de la proteína GAL4	H₂O₂	peróxido de hidrógeno
BME3	BLUE MICROPYLAR END 3	Hig	higromicina
Ca²⁺	calcio	JA	ácido jasmónico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario	Kan	kanamicina
Col-0	Columbia-0 (ecotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i>)	KAO	ent-kaureno ácido oxidasa
CTAB	bromuro de cetil trimetilamonio	KO	ent-kaureno oxidasa
DEPC	dietil pirocarbonato	KS	ent-kaureno sintasa
DNA	ácido desoxirribonucleico	LB	medio de cultivo Luria-Bertani
DNasa	desoxirribonucleasa	LEC	LEAFY COTYLEDON
dNTP	deoxinucleótidos trifosfato	MADS-box	MINICHROMOSOME MAINTENANCE, AGAMOUS, DEFICIENS,SERUM RESPONSE FACTORS
D.O.	densidad óptica (nm)	MAPK	proteín-kinasa activada por mitógeno
DTT	ditiotreitól	MG132	compuesto inhibidor del proteosoma
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético	mRNA	ácido ribonucleico mensajero
ET	etileno	MS	medio de cultivo
FLC	FLOWERING LOCUS C		
FT	factor de transcripción		
GARE	elemento de respuesta GAs		

	Murashige y Skoog	SA	ácido salicílico
NO	óxido nítrico	SDS	dodecil sulfato sódico
PAC	paclobutrazol	SOC	medio nutritivo para el crecimiento de células competentes
pb	pares de bases		
PCR	reacción en cadena de la polimerasa	SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE
Q RT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real	TAE	tampón Tris-acetato EDTA
Rif	rifampicina	T-DNA	DNA de transferencia
RNA	ácido ribonucleico	TE	tampón Tris-EDTA
RNasa	ribonucleasa	Tris	tris (hidroximetil) aminometano
rpm	revoluciones por minuto		
rRNA	ácido ribonucleico ribosómico		

Resumen



El inicio de la germinación de una semilla es una etapa clave en el ciclo de vida de una planta. Un embrión de pocas células en estado quiescente o durmiente rompe la cubierta que le rodea e inicia un complejo programa de desarrollo que le conducirá en último término a la formación de una planta adulta. Bajo esta perspectiva, se entiende que este proceso esté altamente regulado por factores internos y ambientales. La semilla puede definirse como el producto maduro de un óvulo fecundado del cual partirá un nuevo individuo vegetal. Su función es la de multiplicar y perpetuar la especie a la que pertenece. Por lo tanto, es uno de los elementos más eficaces para que la especie se disperse, en el tiempo y en el espacio (Nambara y Nonogaki, 2012).

Las semillas son un pilar fundamental para la actividad humana. Su utilización permitió el desarrollo de la agricultura, dando lugar a uno de los mayores cambios históricos. El desarrollo de nuevas tecnologías para aumentar, tanto la mejora de los cultivos como la seguridad alimentaria puede llevarse a cabo intentando determinar la genética de desarrollo y la química de las reservas de las semillas. Las semillas utilizadas bien como alimento para el hombre o bien como alimento animal suponen más de un 70% de las entradas calóricas a nivel mundial y este conocimiento podría tratar de paliar las demandas alimentarias en una población mundial en aumento (Revisado por Martínez-Andújar et al., 2012).

El uso de semillas como fuente de biocombustibles ayuda a mejorar la calidad de vida y la economía local de países en vías de desarrollo, debido a que la energía producida por estos biocombustibles puede usarse por ejemplo, como electricidad (Gilbert, 2011).

La ciencia de las semillas es un área de gran relevancia dentro de la Fisiología Vegetal. La secuenciación del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* ha permitido disponer de una valiosa herramienta de investigación, empleándose como modelo para comprender la biología de numerosos cultivos. Con la finalidad de asegurar la supervivencia de la especie, en plantas superiores, la formación de semillas combina el desarrollo del embrión con una serie de procesos fisiológicos y un control por parte de factores hormonales y ambientales. La célula vegetal debe percibir el estímulo y poner en funcionamiento un complejo mecanismo de transmisión de la señal hasta el núcleo, que en último lugar active la expresión de genes específicos. Los avances en estudios a nivel transcriptómico (Ogawa et al., 2003, Nakabayashi et al., 2005, Penfiel et al., 2006, Carrera et al., 2007, Spencer et al., 2007, Day et al., 2008, Preston et al., 2009, Linkies et al., 2009, Le et al., 2010, Okamoto et al., 2010, Yamamoto et al., 2010), a nivel proteómico (Rajjou et al., 2004, 2008) y a nivel metabólico (Kliebenstein et al., 2001, Fait et al., 2006, Lepiniec et al., 2006, Macquet et al., 2007, Bai et al., 2012) han permitido ampliar el conocimiento sobre la biología de semillas de *Arabidopsis*.

Las hormonas vegetales tienen un papel fundamental en la regulación de las diferentes etapas a lo largo de la vida de una planta. Existen varias sustancias reguladoras del crecimiento que actúan como moléculas señalizadoras en la germinación de semillas (Koorneef et al., 1982, Karssen et al., 1983, Satler et al., 1985, Abeles, 1986, Nambara et al., 1991, Wilen et al., 1991, Giraudat et al., 1992, Staswick et al., 1992, Melan et al., 1993, Bleecker et al., 1998, Steber et al., 1998, Beaudoin et al., 2000, Beligni y Lamattina, 2000, Ghassemian et al., 2000, Lovegrove y Hooley, 2000, Hays et al., 2001, Lopez-Molina et al., 2001, Steber y McCourt, 2001, Ellis y Turner, 2002, Friml et al., 2002, Friml et al., 2003, Gazzarrini y McCourt, 2003, Nambara y Marion-Poll 2003, Chen et al., 2004, Ali-Rachedi et al., 2004, Kushiro et al., 2004, Yamauchi et al., 2004, Chiwocha et al., 2005, Weijers y Jürgens, 2005, Achard et al., 2006, Bethke et al., 2006, Bentsink et al., 2006, Libourel et al., 2006, Millar et al., 2006, Penfield et al., 2006, Pirrello et al., 2006, Sarath et al., 2006, Seo et al., 2006, Liu et al., 2007, Ariizumi y Steber 2007, Li et al., 2007, Yamaguchi et al., 2007, Holdsworth et al., 2008, Finkelstein et al., 2008, Piskurewicz et al., 2008, Linkies et al., 2009, Penfield y Hall, 2009, Preston et al., 2009, Bentsink et al., 2010, Liu et al., 2010, Nakabayashi et al., 2010, Kanno et al., 2010, Fernández-Arbaizar et al., 2012).

Estudios previos sugieren que el factor de transcripción de la familia MADS-BOX *AGL67* es un regulador negativo clave en el proceso de germinación. El transcrito *AGL67* tiene un máximo en semilla seca y coexpresa con un elevado número de genes relacionados con la ausencia de germinación (Bassel et al., 2011). Sus niveles aumentan en condiciones que inhiben o dificultan la germinación (Bassel et al., 2008); y decaen tras el proceso de imbibición hasta niveles prácticamente imperceptibles (Nakabayashi et al., 2005). Asimismo, semillas mutantes en este gen tienen menor grado de dormición que el tipo silvestre (Nambara, comunicación personal, 2010, Bassel et al., 2011). Sin embargo, las evidencias directas de la localización del transcrito y la proteína en la semilla, la regulación de la acumulación de *AGL67* y la ruta de señalización de este factor de transcripción son todavía en gran parte desconocidas. En colaboración con el Dr. Eiji Nambara (Universidad de Toronto, Canadá), el objetivo principal que se plantea en este trabajo es identificar nuevos componentes moleculares implicados en la ruta de señalización de *AGL67* y su conexión con las dos principales hormonas que regulan la germinación, el ABA y las GAs. Para ello, utilizamos *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo por las características propias de esta planta: genoma de pequeño tamaño y completamente secuenciado, amplias colecciones de mutantes y herramientas genéticas y por la facilidad de su manejo en el laboratorio.

Los factores de transcripción regulan la expresión de genes. El control de su actividad es crucial en el comienzo de la germinación. Los genes pertenecientes a la

familia MADS-box codifican factores de transcripción que juegan papeles importantes en un amplio rango de organismos eucariotas (levaduras, plantas, insectos, anfibios y mamíferos). Así, en levadura, el factor de transcripción MCM1 es necesario en la respuesta a feromonas. En *Drosophila*, SRF interviene en la regulación del desarrollo de la tráquea. En mamíferos, RSRF/MEF2 están implicados en la transcripción de genes específicos de músculo. En plantas, un elevado número de factores de transcripción pertenecientes a esta familia génica muestran relación con el desarrollo de órganos florales. En *Arabidopsis*, esta familia comprende más de cien genes con funciones descritas en prácticamente cualquier etapa del desarrollo de la planta (Snacznik et al., 2012). Aunque son numerosos los genes de la familia MADS-box que se expresan durante el desarrollo del embrión y la semilla en *Arabidopsis thaliana* (Lehti-Shiu et al., 2005, Bemer et al., 2008, Colombo et al., 2008, Kang et al., 2008, Bermet et al., 2010), únicamente a unos pocos se les ha atribuido una función específica en esta etapa del desarrollo (Heck et al., 1995, Perry et al., 1999, Harding et al., 2003, Thakare et al., 2008, Zheng et al., 2009).

El nombre MADS-box proviene de las iniciales de los genes de *Saccharomyces cerevisiae*, *MINICHROMOSOME MAINTENANCE1* (MCM1), *AGAMOUS* (AG) en *Arabidopsis thaliana*, *DEFICIENS* (DEF) en *Antirrhinum majus* y *SERUM RESPONSE FACTORS* (SRF) en *Homo sapiens* (Schwarz-Sommer et al., 1990). Esta familia de proteínas se caracteriza por la presencia de un dominio de unión a DNA altamente conservado a lo largo de la evolución y denominado dominio MADS (Messenguy et al., 2003).

Los factores de transcripción MADS-box actúan en forma de homo o heterodímeros. Estos complejos multiméricos se unen a una región presente en la zona promotora de los genes diana, conocida como caja CARG, constituida por los nucleótidos 5'-CC(A/T)₆GG-3' o a secuencias muy similares (Kauffman et al., 2009, Zobel et al., 2010).

Existen similitudes entre el dominio MADS y la subunidad A de la topoisomerasa IIA (TOPOIIA-A). Diferentes estudios sugieren que la TOPOIIA-A sufrió una duplicación en un antecesor común de todos los eucariotas. Una de las copias mantuvo actividad topoisomerasa, necesaria entre otras funciones para la replicación del DNA, mientras que la otra copia llegó a ser el antecesor común de los miembros de la familia MADS-box, necesaria para la unión a la secuencia CARG presente en el promotor de los genes diana (Revisado por Gramzow et al., 2010).

Análisis filogenéticos en plantas han permitido obtener una clasificación de los miembros de la familia génica MADS-box. Éstos han sido divididos en dos subfamilias: subfamilia génica tipo I, que a su vez se divide en 3 grupos (M α , M β y M γ) en función de

la presencia o ausencia de motivos conservados en la región carboxi-terminal de la proteína (De Bodt et al., 2003, Paternicová et al., 2003, Yoo et al., 2006); y subfamilia génica tipo II, dividida en los grupos MICK^C y MICK^{*}. Esta clasificación se basa en el número de exones que codifican el dominio I de la proteína y por las diferencias estructurales del dominio K (Henschel et al., 2002). A su vez, las proteínas MICK^{*} pueden dividirse en clase S y clase P (Figura 1).

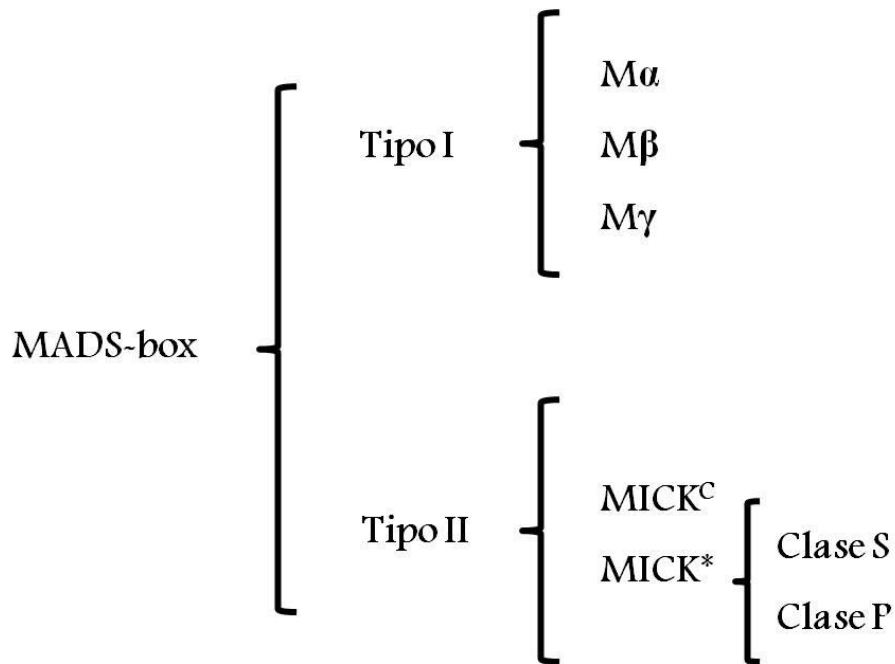


Figura 1. Clasificación filogenética de los factores de transcripción tipo MADS-box.

Ambas subfamilias (tipo I y tipo II) presentan una serie de rasgos diferenciales que se detallan a continuación y que aparecen resumidos en la tabla 1:

- Los genes pertenecientes a la subfamilia tipo I constan de 1 o 2 exones, mientras que los genes pertenecientes a la subfamilia tipo II presentan una media de 7 exones (De Bodt et al., 2003).
- Los genes pertenecientes a la subfamilia tipo I muestran un mayor índice de natalidad-mortalidad en comparación a los genes pertenecientes a la subfamilia tipo II (Nam et al., 2004).
- Los genes pertenecientes a la subfamilia tipo I han sufrido duplicaciones génicas en una escala menor que los genes pertenecientes a la subfamilia tipo II (Bemer et al., 2010).

Tabla 1. Diferencias entre las subfamilias tipo I y tipo II de la familia MADS-box.

Características	Tipo I	Tipo II
Número de exones	1 o 2	7
Índice de natalidad-mortalidad	+	~
Duplicaciones génicas	~	+

Estudios con mutantes de *Arabidopsis thaliana* han permitido demostrar que los genes pertenecientes a la subfamilia tipo I presentan importancia durante el desarrollo de la semilla, saco embrionario y gametofito femenino. Así, mutantes *agl23* presentan detenido el desarrollo del gametofito femenino (Colombo et al., 2008). Los factores de transcripción AGL80 y AGL61 actúan formando dímeros en la diferenciación de la célula central del gametofito femenino (Bemer et al., 2008, Portereiko et al., 2006). AGL37 presenta un importante papel durante el desarrollo de la semilla (Kohler et al., 2003). Además, mutantes *agl62* sufren una formación prematura de las paredes celulares en el endospermo (Kang et al., 2008).

Dentro de los genes de la subfamilia tipo II, los más ampliamente estudiados son los pertenecientes al grupo MICK^C (revisado por Becker y Theissen, 2003, De Bodt et al., 2003, Kaufman et al., 2005, Liu y Mara, 2010, Melzer et al., 2010). En musgos y helechos, estos genes se expresan en el esporofito y en el gametofito. En *Arabidopsis*, *AGL18* es el único gen cuya expresión se encuentra localizada en el gametofito. Los genes pertenecientes a este grupo filogenético controlan varios aspectos del desarrollo del esporofito. De este modo, son capaces de determinar el tiempo de floración, como es el caso de *SUPPRESSOR OF CONSTANS1 (SOC1)*, *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*, *MADS AFFECTING FLOWERING1 (MAF1)* y *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*; la identidad del meristemo floral, como *APETALA1 (AP1)*, *FRUITFULL (FUD)*, *CAULIFLOWER (CAD)*; la identidad del órgano floral, como *AP1*, *SEPALLATA1 (SEP1)*, *SEPALLATA2 (SEP2)*, *SEPALLATA3 (SEP3)*, *SEPALLATA4 (SEP4)*, *APETALA3 (AP3)* y *AGAMOUS (AG)*; la formación del fruto, como *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHATTERPROOF2 (SPH2)* y *FRUITFULL (FUD)* y la pigmentación de la semilla, como

ARABIDOPSIS BSISTER (ABS). Por otro lado, los genes pertenecientes al grupo MICK* se descubrieron posteriormente. Sus funciones están asociadas con el desarrollo del gametofito, y coinciden con el lugar de expresión. En *Arabidopsis*, la expresión de estos genes se encuentra en el gametofito masculino Adamczyk et al. (2009) comprobaron que el desarrollo del tubo polínico y la maduración del polen está mediada por la formación de heterodímeros entre 5 de los 6 miembros de este grupo: AGL30, AGL104, AGL66, AGL65 y AGL94.

El análisis de la secuencia aminoacídica de la proteína AGL67 con el resto de proteínas pertenecientes al grupo MICK* (AGL30, AGL104, AGL66, AGL65 y AGL94) revela la alta conservación del dominio MADS característico de esta familia génica. Para tener un mayor conocimiento sobre el grado de conservación de AGL67 a lo largo de la evolución, se realizó un estudio comparativo de esta proteína de *Arabidopsis thaliana* y de sus homólogas en las diferentes especies de plantas presentes en la base de datos phytozome (www.phytozome.net). Los datos obtenidos nos indican que el clado constituido por las algas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Coccomyxa subellipsoidea C-169*, *Micromonas pusilla CCMP1545*, *Micromonas pusilla RCC299*, *Ostreococcus lucimarinus*) carece de AGL67, lo que sugiere la importancia de los miembros de esta familia en diferentes procesos del desarrollo tras la colonización del medio terrestre. Por otro lado, la alta similitud entre el árbol de especies y el árbol de AGL67 en la familia de las Brasicáceas sugiere un elevado nivel de conservación de este gen y por lo tanto su transcendencia dentro de la familia génica MADS-box.

1. AGL67 actúa como represor del inicio de la germinación en la ruta de señalización de las giberelinas (GAs).

La familia de factores de transcripción MADS-box en *Arabidopsis* comprende más de cien genes con funciones descritas en prácticamente cualquier etapa del desarrollo de la planta (Snaczniak et al., 2012). Uno de los ejemplos mejor estudiados es la floración. Así, factores de transcripción de esta familia regulan la expresión de genes que son esenciales para el crecimiento, forma y estructura de las flores (Ito, 2011, Dornelas et al., 2011).

Aunque son numerosos los genes de la familia MADS-box que se expresan durante el desarrollo del embrión y la semilla en *Arabidopsis thaliana*, como es el caso de *PHERES1 (PHE1)*, *DIANA (DIA)*, *AGL23*, *AGL62*, *AGL28*, *AGL40*, *AGL57*, *AGL59*, *AGL64*, *PHE2*, *AGL35*, *AGL36* y *AGL90* (Lehti-Shiu et al., 2005, Bemer et al., 2008, Colombo et al., 2008, Kang et al., 2008, Bermet et al., 2010), únicamente a unos pocos se les ha atribuido una función específica en esta etapa del desarrollo (Heck et al., 1995, Perry et

al., 1999, Harding et al., 2003, Thakare et al., 2008, Zheng et al., 2009). En este sentido, AGL15 actúa sobre los genes *LEC2*, *FUSCA3* y *ABI3* que a su vez presentan un papel clave durante la embriogénesis. Un patrón similar de expresión ha sido descrito para diferentes miembros de factores de transcripción de esta familia génica en arroz y en cebada (Arora et al., 2007, Lin-lin et al., 2012, Kapazoglou et al., 2012, Papaefthimiou et al., 2012).

Estudios previos sugieren que el factor de transcripción AGL67 es un regulador negativo clave en el proceso de germinación: (1) El transcrito tiene un máximo en semilla seca y coexpresa con un elevado número de genes relacionados con la ausencia de germinación (Bassel et al., 2011) (Figura 2); (2) sus niveles aumentan en condiciones que inhiben o dificultan la germinación (Bassel et al., 2008); (3) sus niveles decaen tras el proceso de imbibición hasta niveles prácticamente imperceptibles (Nakabayashi et al., 2005); y (4) semillas mutantes en este gen tienen menor grado de dormición que el tipo silvestre (Bassel et al., 2011). Estos resultados tomados en su conjunto sugieren que AGL67 desempeña un papel fundamental como represor de la germinación, pudiendo actuar de forma análoga al gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, también perteneciente a la familia MADS-box, y que actúa como represor en el inicio de la floración (Chiang et al., 2009). Sin embargo, las evidencias directas de la localización del transcrito y la proteína en la semilla, la regulación de la acumulación de AGL67 y la ruta de señalización de este factor de transcripción son todavía en gran parte desconocidas.

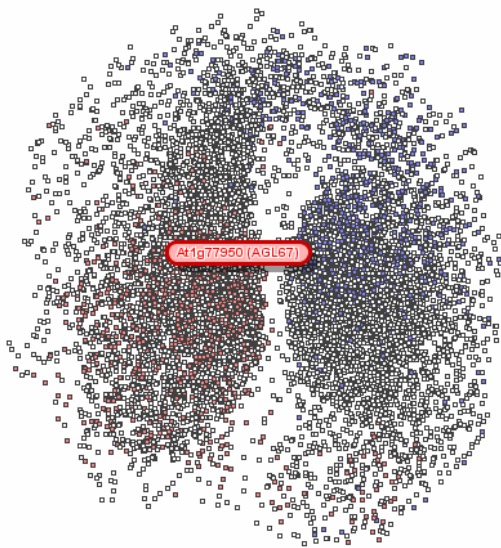


Figura 2. *AGL67* coexpresa con un elevado número de genes relacionados con la ausencia de germinación. En rojo se representan aquellos genes cuya expresión está inducida en condiciones de no germinación. En azul se representan aquéllos cuya expresión esta inducida en condiciones de germinación (SeedNet, <http://bree.cs.nott.ac.uk/arabidopsis>)

La utilización de una línea “gene-trap” en el gen *AGL67* nos ha permitido visualizar la acumulación del transcrito en los últimos estadios de la embriogénesis. Mediante la detección de la actividad glucuronidasa (GUS) asociada a esta línea hemos confirmado, de este modo, los resultados obtenidos por Bassel et al. (2011) tras recopilación de numerosos estudios transcriptómicos para los genes implicados en la transición entre dormición y germinación. Estos autores muestran en su estudio que *AGL67* coexpresa con un gran número de genes cuya expresión está regulada positivamente por ABA (inhibidor de la germinación) y negativamente por GAs (promotoras de la germinación) (Tabla 2).

Tabla 2. Genes que coexpresan con *AGL67* durante la germinación de semillas (SeedNet, <http://bree.cs.nott.ac.uk/arabidopsis>).

AGI	Regulación positiva por ABA	Regulación positiva por GAs	Descripción de la proteína
At2g45620	Sí		Nucleotidiltransferasa
At1g07530	Sí		SCL14
At1g15180	Sí	Sí	Proteína relacionada con el eflujo de MATE
At3g51860	Sí		CAX3
At1g21450		Sí	SCL1
At2g42890		Sí	AML2
At1g21000	Sí		Proteína con función desconocida
At1g04300	Sí		Superfamilia TRAF
At5g61590		Sí	Codifica un miembro de ERF
At1g14740		Sí	Codifica la proteína PHD
At3g20770	Sí		EIN3
At3g20250	Sí	Sí	APUM5
At1g13640	Sí	Sí	Fosfatidilinositol 3- y 4-kinasa
At3g56880	Sí	Sí	APUM5

Al igual que sucede con *FLC* y la regulación de la señalización del ABA (Chiang et al., 2009), la coexpresión entre *AGL67* y genes de la señalización de ABA y GAs sugiere que *AGL67* pudiera actuar como punto de unión entre las rutas de señalización de ABA y GAs, en el equilibrio que mantienen ambas hormonas para el control del comienzo de la

germinación. De este modo, se sabe que mientras mutantes en la enzima GA2-oxidasa, implicada en la inactivación de las GAs, muestran un incremento en los porcentajes de germinación (Yamauchi et al., 2007), mutantes inactivados en los genes *CYP707A1* y *CYP707A2* muestran un aumento en los niveles de dormición, como consecuencia de un incremento en la acumulación de ABA (Okamoto et al., 2006). En el año 2004, Wang et al. determinaron que el factor de transcripción *AGL15* regula directamente la expresión de *DOWNSTREAM TARGET OF AGL15-1 (DTA1)*, un factor de transcripción que codifica un gen con actividad GA-oxidasa y que se expresa al igual que *AGL15* durante el desarrollo embrionario. La sobreexpresión del gen *DTA1* da lugar a fenotipos propios de mutantes deficientes en GAs. Gran parte de estas características fenotípicas son coincidentes con las descritas en las líneas sobreexpresoras del gen *AGL15* (Fernández et al., 2000). Además, la cantidad de GA₄ (GA bioactiva) es menor en las plantas sobreexpresoras de *DTA1* y *AGL15* que en el tipo silvestre. El gen *DTA1* presenta un papel en la dormición de semillas. Así, se ha comprobado que el porcentaje de germinación del mutante pérdida de función *dta1* es mayor que el del tipo silvestre y que las líneas sobreexpresoras de *DTA1* germinan en menor medida. Las semillas carecían de tratamiento frío para evitar favorecer la rotura de la dormición. Por otro lado, el bajo porcentaje de germinación de las líneas sobreexpresoras es rescatado tras la adición de GA₄₊₇. Además, semillas del mutante *dta1* tratadas con el inhibidor de la síntesis de GAs paclobutrazol (PAC) germinan en mayor medida que semillas del tipo silvestre. Del mismo modo, se sabe que mutantes con sensibilidad reducida a ABA o con niveles reducidos de la hormona, muestran resistencia a PAC durante la germinación (Koornneef et al., 1998). El uso de otros inhibidores de la síntesis de GAs como el uniconazol en mutantes insensibles a ABA, como *abi1-1* o *abi3-1*, ha evidenciado resultados semejantes, demostrando que este tipo de mutantes requiere menores niveles de GAs para iniciar la germinación (Steber et al., 1998).

Los resultados obtenidos en la presente memoria parecen confirmar la hipótesis de que *AGL67* pudiera actuar como punto de unión en las rutas de señalización de ABA y GAs. Así, los mutantes de pérdida de función de *AGL67* presentan cierto grado de insensibilidad a la adición exógena de ABA y de PAC; mientras las líneas de ganancia de función de *AGL67* presentan hipersensibilidad a la adición exógena de PAC, aunque no a la adición exógena de ABA.

El cierto grado de insensibilidad de los mutantes de pérdida de función de *AGL67* en condiciones de estrés salino (NaCl) y osmótico (Manitol) sugiere que *AGL67* pudiera también participar en la ruta de señalización de las respuestas de la planta a estas condiciones de estrés. Numerosos genes implicados en el mantenimiento de la dormición y la ausencia de germinación se expresan también de forma mayoritaria en las respuestas

de la planta en condiciones de estrés abiótico (Bassel et al., 2011). Así, Tardif et al. (2007) determinaron que un elevado número de miembros de la familia MADS-box en maíz estaban relacionados con la respuesta a estreses abióticos. En arroz, los genes *OsMADS18*, *OsMADS22*, *OsMADS26* y *OsMADS27* están regulados positivamente por estreses salinos, estrés por frío y estrés por sequía. Mientras que los genes, *OsMADS2*, *OsMADS30* y *OsMADS55* se encuentran regulados negativamente por el mismo tipo de estreses (Arora et al., 2007). El gen *ZMM7-L* de maíz está regulado de modo positivo por estreses abióticos y de forma negativa por ABA. Además, las líneas sobreexpresoras de este gen germinan en menor medida que el tipo silvestre en presencia de cloruro sódico (NaCl) y manitol, sugiriendo el posible papel negativo de *ZMM7-L* en la respuesta de la planta a estreses abióticos (Zhang et al., 2012).

A diferencia de la respuesta frente a la adición exógena de ABA, el fenotipo opuesto que presentan las líneas de pérdida (insensibilidad) y ganancia (hipersensibilidad) de función en presencia de PAC sugiere que los niveles de *AGL67* regulan *per se* la respuesta a la acumulación de las GAs en el proceso de germinación. Así, el aumento de expresión de *AGL67* tras la adición de PAC parece indicar que las GAs reprimen la transcripción de *AGL67*, aunque este resultado no permite excluir una posible regulación adicional a otros niveles. Estos resultados confirman los obtenidos previamente por Cao et al. (2006) tras un exhaustivo análisis transcriptómico en distintos fondos genéticos relacionados con la biosíntesis y señalización de las GAs. Dichos autores mostraron que *AGL67* es regulado positivamente por las proteínas DELLA para reprimir el comienzo de la germinación.

El análisis transcriptómico de los genes inducidos en el fondo genético del mutante *agl67* evidencia que *AGL67* actúa reprimiendo la expresión de genes reguladores positivos de la biosíntesis de GAs, como los genes *BME3* (Liu et al., 2005) y *GASA1* (Aubert et al., 1998). Los niveles de GAs son determinantes para que se produzca la germinación, Así, se ha comprobado que en semillas del tipo silvestre de *Arabidopsis*, las GAs favorecen la germinación y que el mutante *gai-1*, deficiente en la producción de GAs, muestra alteraciones durante esta etapa del desarrollo de la planta (Debeaujon y Koornneef, 2000). Además, el tratamiento con inhibidores de la síntesis de GAs, como PAC y uniconazol, impide la germinación (Nambara et al., 1991, Jacobsen y Olszewsky, 1993). Los genes codificados por la familia de proteínas GASA de *Arabidopsis* son regulados de modo positivo por GAs. Esta familia de proteínas consta de 14 miembros que actúan en diferentes aspectos del desarrollo de la planta, entre los que se encuentran la germinación de semillas (Roxrud et al., 2007, Rubinovich et al., 2010). Por su parte el factor de transcripción *BME3* actúa como regulador positivo de la germinación de semillas, favoreciendo la biosíntesis de GAs activas. En el análisis transcriptómico

también aparecen reprimidos genes con actividad hidrolasa, como *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE6 (XTR6)*, *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE7 (XTR7)*, *XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE17 (XTR17)*, *BETA GLUCOSIDASE4 (BGLU4)* y *BETA GLUCOSIDASE44 (BGLU44)*, que actúan como agentes remodeladores de la pared celular en los procesos de elongación asociados a la acción de las GAs (Nonogaki, 2008). En cereales, los genes que codifican enzimas con actividad hidrolasa y que movilizan las sustancias de reserva responden a GAs mediante un motivo en *cis* conservado llamado GARC. Este motivo es reconocido por factores de transcripción pertenecientes a las familias MYB y DOF. Sin embargo, no parece estar presente en los promotores inducibles por GAs en dicotiledóneas (Ogawa et al., 2003). La activación de genes con actividad hidrolasa durante la germinación de semillas de monocotiledóneas está controlada principalmente por el factor de transcripción GAMYB, inducible por GAs, que reconoce el elemento GARE del complejo GARC presente en los promotores de los genes regulados (Sun y Gubler, 2004). Junto con GAMYB, los factores de transcripción tipo ZINC-FINGER PROTEINS (DOF): STEAROYL DESATURASE (SAD), BPBF, DOF17 y DOF19, son reguladores negativos, excepto SAD que es activador, de esta respuesta, mediante su unión a la caja de pirimidinas presente en el complejo GARC (La Moneda et al., 2003, Mena et al., 2002, Moreno-Risueño et al., 2007). En *Arabidopsis*, los factores de transcripción tipo DOF, DAG1 y DAG2 son reguladores negativo y positivo, respectivamente, de la germinación (Gualberti et al., 2002). Por otro lado, en la remodelación de la pared celular intervienen, entre otras, un grupo de proteínas conocidas con el nombre de α -expansinas. Este tipo de proteínas son codificadas por genes inducibles por GAs. En el mutante deficiente en GAs, *gal-3* hay una acumulación aproximadamente 200 veces mayor de *EXPANSINA2* tras tratamiento con GAs. En este mismo sentido las α -expansinas se localizan en el endospermo, donde tiene lugar un incremento en la biosíntesis de GAs tras estratificación por tratamiento frío (Penfield et al., 2006, Carrera et al., 2008, Linkies et al., 2009, Yamauchi et al., 2004).

2. Relevancia fisiológica de la regulación transcripcional que ejerce AGL67 sobre BME3 en los fenotipos en presencia de PAC.

La introducción del transgén *BME3GUS* en el fondo genético del mutante pérdida de función *agl67-1* nos ha permitido confirmar que *AGL67* reprime la expresión de *BME3* y caracterizarla como independiente de la adición exógena de ABA. Liu et al. (2005) mostraron que los mutantes de pérdida de función en el gen *BME3* presentan mayor dormición que el tipo silvestre y que este fenotipo se revierte tras la adición exógena de GAs. En base a estos y otros resultados, los autores concluyeron que el factor

de transcripción *BME3* actúa como regulador positivo de la germinación de semillas en *Arabidopsis*, promoviendo la expresión de genes implicados en la biosíntesis de GAs.

El fenotipo opuesto que presentan los mutantes de pérdida de función en los genes *BME3* y *AGL67* en presencia de PAC sugiere que la insensibilidad a PAC en el mutante *agl67* se debe a la acumulación del transcrito *BME3* en ausencia de su represor. Estudios con el doble mutante *agl67bme3* en presencia de PAC permitirán confirmar la relevancia biológica de la regulación transcripcional que ejerce *AGL67* en *BME3* en los fenotipos en presencia de PAC. Este tipo de estudios han sido utilizados en mutantes de respuesta a ET (*ctr1*, *etr1*, *ein2*, *ein3*, *ein5*, *ein6* y *ein7*) (Kieber et al., 1993, Lubarsky et al., 1995).

La relación funcional que parece establecerse entre *AGL67* y *BME3* sugiere la existencia de un circuito de auto-regulación positiva (Figura 3), donde *AGL67* reprimiría la expresión de *BME3*, la ausencia de *BME3* disminuiría los niveles de GAs (Liu et al., 2005), y por consiguiente aumentaría la estabilidad de las DELLA, que actuarían como promotores de la expresión de *AGL67* (Cao et al., 2006). De acuerdo con esta idea, circuitos de autoregulación positiva se han descrito para otros genes de la familia MADS-box, como *SEP3* (Wagner et al., 2009), *AGL24* y *SOC1* (Liu et al., 2008).

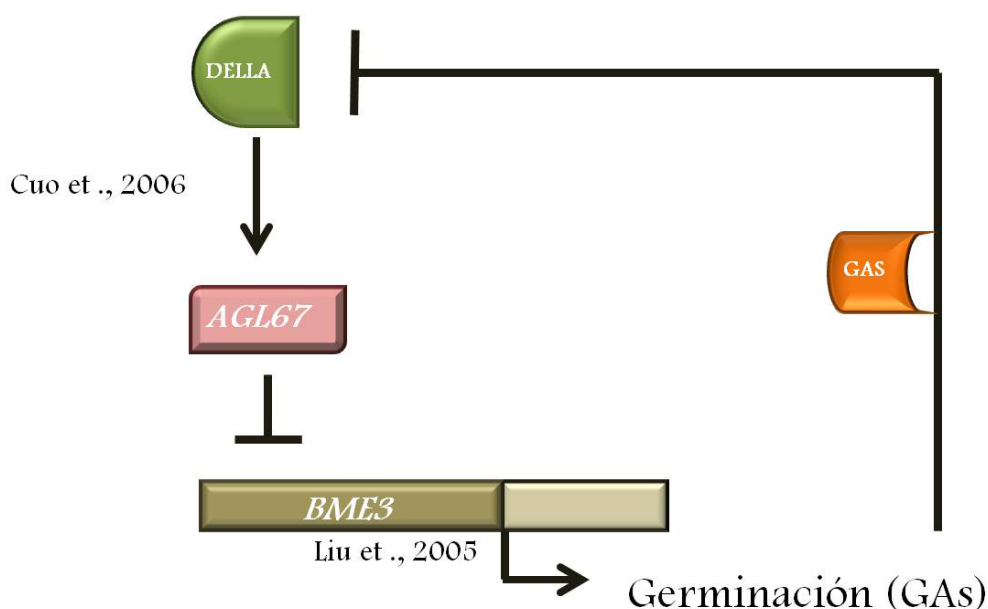


Figura 3. La inducción del gen *AGL67* por parte de las proteínas DELLA conlleva la inhibición de la germinación de semillas de *Arabidopsis* a través de la represión del factor de transcripción *BME3*, el cual es un regulador positivo de la germinación, mediante el incremento de GAs bioactivas. La disminución en los niveles de GAs bioactivas trae consigo un incremento de los represores DELLA.

En relación con la unión de AGL67 al DNA, trabajos pioneros en la década de los 90 permitieron identificar una secuencia consenso (caja CARG) a la que se unen los factores de transcripción de la familia MADS-box, actuando como dímeros (Schwarz-Sommer et al., 1992, Davies et al., 1996). En este sentido, se ha podido determinar que las proteínas, AG, AP1, AP3, PISTILLATA (PI), AGL15, FLC, SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) y SOC1 se unen específicamente a la secuencia CARG o a modificaciones de la misma, dependiendo de la proteína de estudio (Huang et al., 1993, Shiraishi et al., 1993, Riechmann et al., 1996, Hepworth et al., 2002, de Folter y Angenet, 2006, Lee et al., 2007, Lee et al., 2008). Sin embargo, numerosos trabajos evidencian que el nivel de complejidad en el reconocimiento entre el factor de transcripción tipo MADS-box y el DNA es mucho mayor, pudiendo coexistir en un mismo complejo factores de transcripción de otras familias, represores y factores remodeladores de cromatina (Sridhar et al., 2006, Turck et al., 2007, Zhang et al., 2007, Liu et al., 2009, Sun et al., 2009, Smaczniak et al., 2012, Wu et al., 2012). Una secuencia que se ajusta a la secuencia consenso CARG (CTTAAATG) se encuentra de forma única en la región promotora del gen *BME3*. El ensayo de híbrido sencillo en levadura entre la proteína AGL67 y la secuencia CTTAAATG ha descartado la interacción entre estos dos elementos bajo las condiciones de estudio. La ausencia de interacción sugiere, (1) que AGL67 no regula directamente la expresión de *BME3* o (2) la necesidad de la interacción de AGL67 con otras proteínas para mediar la activación de la expresión de *BME3*.

3. AGL67 está regulado a nivel post-traduccional.

Como hemos citado en apartados anteriores, la capacidad de unión de algunos factores de transcripción de la familia MADS-box a la secuencia consenso CARG depende de la formación de dímeros (Schwarz-Sommer et al., 1992, Davies et al., 1996). Así, por ejemplo, en el proceso de formación del polen, los heterodímeros AGL65-AGL104, AGL30-AGL104 y AGL30-AGL66 reconocen secuencias de este tipo en los promotores de determinados genes, regulan su expresión y controlan finalmente la actividad del polen (Verelst et al., 2007, Adamczyk y Fernández, 2009). La composición de los heterodímeros identificados sugiere que existen ciertas reglas en cuanto al tipo de monómeros que los pueden formar: las proteínas homólogas a AGL66, AGL67 y AGL104 (clase S) interaccionan con las proteínas homólogas a AGL30, AGL65 y AGL94 (clase P). En base a las evidencias experimentales no sería posible que las proteínas homodimerizaran o que se formaran heterodímeros de sólo proteínas de clase S o de clase P. En este mismo sentido, estudios de doble híbrido en levadura de los miembros de la familia MADS-box mostraron que la formación de dímeros se producía entre

miembros de las mismas subfamilias (Tipo I y tipo II) (Immink et al., 2009). Dentro de las proteínas pertenecientes a la subfamilia tipo I, las interacciones se producen preferentemente entre miembros de las diferentes subclases (de Folter et al., 2005). Así, se ha comprobado que las proteínas M_α se unen de forma mayoritaria con proteínas tipo M_β y M_γ , y que las interacciones entre proteínas M_α son raras. En este mismo sentido, las interacciones entre proteínas M_β y M_γ son mínimas. Estos resultados sugieren que las proteínas M_α son las responsables de la estabilización de los complejos (Immink et al., 2009). En *Arabidopsis*, SEP3 es capaz de interactuar con SHP1. Sus ortólogos de petunia, FBP2 y FBP6 respectivamente, también interactúan (Veron et al., 2006).

A diferencia de lo publicado por De Folter et al. (2005), que en su estudio masivo de doble híbrido en levadura entre los factores de transcripción de la familia MADS-box no detectan ninguna interacción para AGL67, nuestros resultados de doble híbrido muestran que AGL67 (clase S) no tiene la capacidad de formar homodímeros, pero sí puede formar heterodímeros con AGL65 (clase P) y otros factores de transcripción distintos de la familia MADS-box (TCP16, NFY-C2, TCP10, TCP14, MYB20), que se expresan también en semilla. Mientras que las interacciones entre proteínas tipo MADS-box de mamíferos y levaduras son frecuentes, en plantas las interacciones de miembros de esta familia con otras familias proteicas son raras. Sin embargo, AG es capaz de interactuar con VEGETATIVE STORAGE PROTEIN1 (VSP1), que presenta actividad fosfatasa ácida y con FLORAL TRANSITION1 (FLOR1), que es una proteína rica en repeticiones de leucina (Gamboa et al., 2001). Por otro lado, la proteína perteneciente a la familia MADS-box de arroz OsMADS18 (Immink et al., 1999) interactúa con la proteína específica de semilla NUCLEAR FACTOR Y SUBUNIT B (NF-YB) (Masiero et al., 2002).

Los ensayos de complementación bimolecular fluorescente confirman que la interacción AGL67-AGL65 también se produce en células de tabaco transformadas transitoriamente y que esta interacción se produce en el núcleo. El hecho de que AGL65 se exprese durante la maduración de la silicua (aunque en menor medida que en polen) (Schmid et al., 2005, Toufighi et al., 2005) y que además el mutante de pérdida de función *agl65* muestre insensibilidad a PAC, sugieren la posibilidad de que el complejo AGL67-AGL65 tenga una actividad relevante en el inicio de la germinación. El análisis del fenotipo del doble mutante *agl67agl65* en presencia de PAC nos aportará más información sobre la importancia de esta interacción. Por otro lado, si la actividad de AGL67-AGL65 conlleva la represión de la expresión de *BME3* está por determinar. Estudios de triple híbrido donde coexistan los dos factores de transcripción (AGL67 y AGL65), y la secuencia CTAAATG, presente en el promotor del gen *BME3* en forma única y descrita como secuencia *cis* de los factores de transcripción de la familia MADS-

box (Schwarz-Sommer et al., 1992), nos permitirán confirmar el papel regulador de esta secuencia en la señalización de AGL67. Ensayos de este tipo han mostrado que los dímeros formados entre las proteínas de tipo MADS-box, AG-SEP1 y AG-SEP3, interaccionan con BEL1 regulando el desarrollo del óvulo en *Arabidopsis* (Bambrilla et al., 2007).

Los reguladores transcripcionales ejercen su función en el núcleo, por lo que suelen presentar señales de localización nuclear (NLS) que dirigen su transporte a este orgánulo una vez que ha concluido su traducción en el citoplasma. La familia de factores de transcripción MADS-box contienen en el dominio MADS una zona rica en residuos básicos, que ha sido identificada como una NLS (Gauthier-Rouviere et al., 1995, McGonigle et al., 1996, Immink et al., 2002). El motivo KR(K/R)X₄KK, situado entre las posiciones 22 y 30 dentro del dominio MADS, es esencial para el transporte del factor de transcripción al núcleo. La expresión transitoria del transgén *AGL67-GFP* en hojas de tabaco (mediante agroinfiltración) y en epidermis de cebolla (mediante bombardeo) ha mostrado que la proteína recombinante AGL67-GFP tiene una localización nuclear y extra-nuclear o exclusivamente nuclear, respectivamente. Sin embargo, el estudio de la localización subcelular de la proteína GFP-AGL67 en las plantas sobrepresoras del gen *AGL67*, nos indica que la proteína se encuentra en la zona extranuclear de las células estudiadas. Este resultado está de acuerdo a lo publicado previamente por Ito et al., 2011, que mediante sucesivos fraccionamientos y análisis por espectrometría de masas, identifican a AGL67 en la fracción citosólica de muestras provenientes de cultivos celulares de *Arabidopsis*. La distinta localización de la proteína (núcleo o citosol) en función del sistema en el que se estudie (tabaco, cebolla o *Arabidopsis*) sugiere la existencia de un posible mecanismo de regulación post-traducciona (además de la transcripción) para el control de la actividad de AGL67. Estos tipos de mecanismos de regulación adicionales, que puede incluir distinta estabilidad de la proteína según el compartimento (Wang et al., 2010), regulación del transporte entre compartimentos (McGonigle et al., 1996, He y Saedler, 2007, Bemer et al., 2008) o transporte intracelular (Perbal et al., 1996, Sieburth et al., 1998, Urbanus et al., 2010), ha sido ya descrito para otras proteínas de la familia MADS-box. Así, por ejemplo, Lee et al. (2008) concluyen que la unión de AGL24 al factor de transcripción SOC1 dirige el complejo al núcleo y activa la expresión del factor de transcripción LFY, regulador clave del desarrollo floral. En este mismo sentido, la formación del heterodímero constituido por los factores de transcripción AP3 y PI, así como el formado por el factor de transcripción UNS, homólogo de SOC1 en petunia, y el factor de transcripción FBP9, perteneciente a la familia MADS-box, , traen consigo una translocación al núcleo (Ferrario et al., 2004, McGonigle et al., 1996). Por otro lado, se ha comprobado que AGL61 es dirigido al

núcleo cuando AGL80 está presente (Bemer et al., 2008). En el caso de las proteínas de petunia de tipo MADS-box: FBP2, FBP5, FBP9 y FBP11, implicadas en la formación del óvulo (Angenent et al., 1995), sólo FBP2, FBP5 y FBP9, capaces de homodimerizar, se encuentran situadas en el núcleo. FBP11, incapaz de homodimerizar, presenta disposición nuclear cuando se coexpresa con otra proteína con la que presenta patrones de interacción (Immink et al., 2002).

La hipótesis de que exista una regulación de la actividad AGL67 a través de su localización celular se refuerza al observar que inhibiendo la actividad del proteosoma en *Arabidopsis* (mediante el compuesto químico MG132) alteramos la localización de la proteína quimérica GFP-AGL67. Así, la localización de la proteína pasa a ser nuclear y extra-nuclear, sin cambios evidentes en su concentración total. El análisis de la localización de la proteína GFP-AGL67 en un fondo genético donde el funcionamiento del proteosoma esté afectado (Ren et al., 2008) nos permitirá confirmar la importancia del proteosoma en el control de la localización celular de AGL67. Teniendo en cuenta que la degradación de las proteínas DELLA es a través de la actividad del proteosoma (Sun et al., 2011) y que las DELLA actúan como reguladores positivos de la expresión de *AGL67* (Cao et al., 2006), una posibilidad interesante sería que el cambio de localización observado tras la adición de MG132 pudiera deberse a que las DELLA regularan también el transporte de AGL67 del citosol al núcleo de la célula (Figura 4). El análisis de la localización de la proteína GFP-AGL67 en un fondo genético deficiente en GAs con la consiguiente acumulación de proteínas DELLA (*ga1-3*) nos permitirá confirmar si esta hipótesis es correcta.

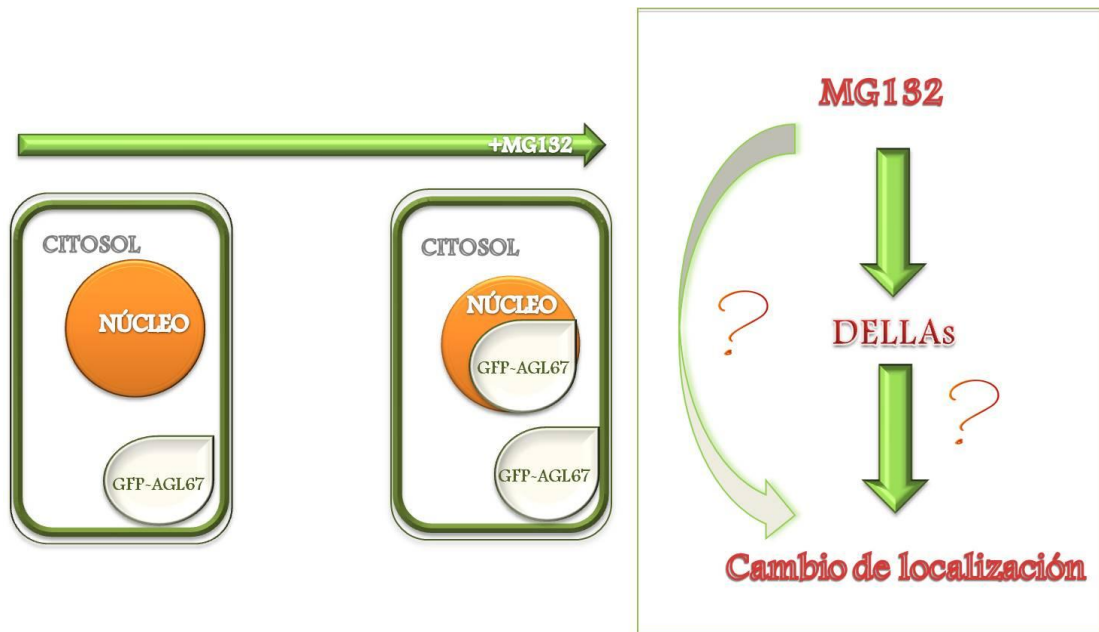


Figura 4. Modelo para la posible localización subcelular de AGL67 en Arabidopsis. En ausencia del compuesto inhibidor del proteosoma MG132, AGL67 se localiza exclusivamente en la región extranuclear de la célula. La acción de MG132 impide la degradación de las proteínas DELLA, que podrían participar en el cambio de localización subcelular de GFP-AGL67 al núcleo de la célula.

Los resultados obtenidos en la presente memoria, así como los datos presentes en la bibliografía, nos permiten plantear el siguiente modelo de actuación para explicar el papel de AGL67 como regulador negativo de la germinación de semillas en Arabidopsis (Bassel et al., 2011). De acuerdo a este modelo (Figura 5), la inducción de *AGL67* a través de la actividad de las proteínas DELLA (Cao et al., 2006) aumentaría los niveles de AGL67 y reprimiría la expresión del gen *BME3*. En este complejo represor, AGL67 sería capaz de reclutar cofactores transcripcionales y factores remodeladores de cromatina que podrían influir en la especificidad de unión a *BME3* (Smaczniak et al., 2012). La represión de *BME3* reduciría los niveles de BME3, conllevaría una disminución en la biosíntesis de GAs activas (Liu et al., 2005) y por consiguiente un aumento en los niveles de proteínas DELLA. De este modo, se cerraría un circuito de auto-regulación positiva para el control de la actividad de AGL67 como represor de la germinación.

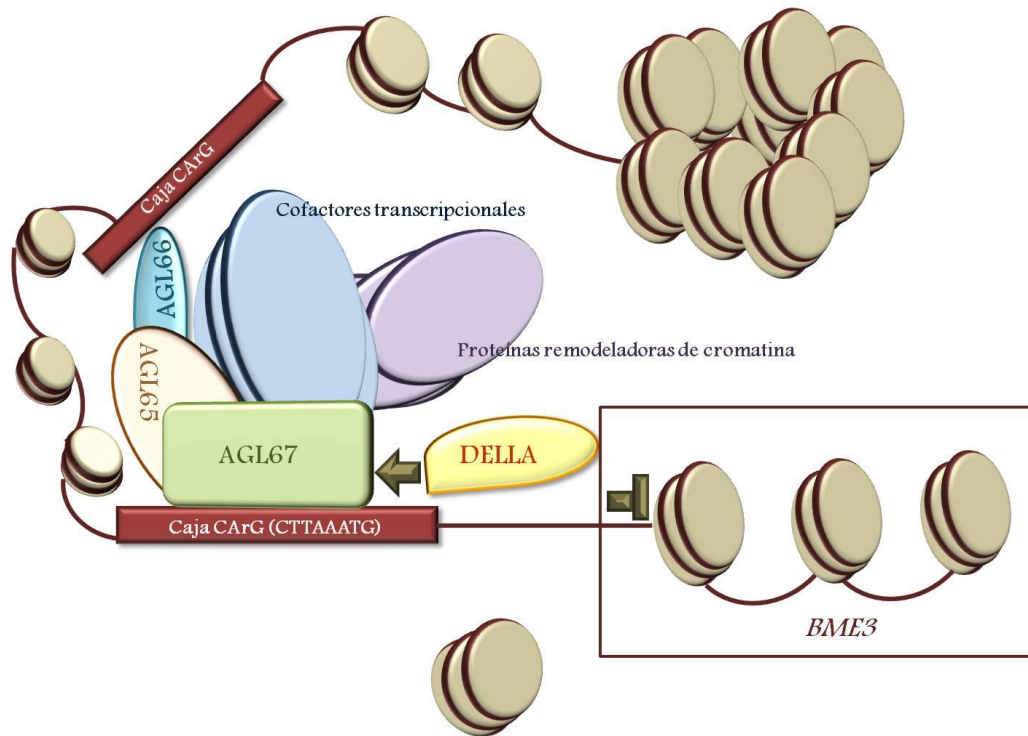


Figura 5. Esquema hipotético de la actuación de *AGL67* para llevar a cabo su mecanismo de acción. En este modelo *AGL67*, inducible por las proteínas *DELLA*, forma un dímero con *AGL65* e interacciona con la secuencia tipo CArG (CTTAAATG), presente en la zona promotora de *BME3*. Además, *AGL67* sería capaz de reclutar cofactores transcripcionales y factores remodeladores de cromatina que podrían influenciar en la especificidad de unión a *BME3*. Adaptado de Smaczniak et al., 2012.

Bibliografía



- Abeles FB** (1986) Role of ethylene in *Lactuca sativa* cv; Grand Rapids' Seed Germination. *Plant Physiology* **81**: 780-787.
- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP** (2006) Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-94.
- Achard P, Liao L, Jiang C, Desnos T, Bartlett J, Fu X, Harberd NP** (2007) DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiology* **143**: 1163-1172.
- Adamczyk BJ, Fernandez DE** (2009) MIKC* MADS domain heterodimers are required for pollen maturation and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **149**: 1713-1723.
- Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R** (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1665-1681.
- Aitchitt M, Ainsworth C, Thangavelu M.** (1993) A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Molecular Biology* **11**: 317-319.
- Alabadí D, Gil J, Blázquez MA, García-Martínez JL** (2004) Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiology* **134**: 1050-1057.
- Alabadí D, Gallego-Bartolomé J, Orlando L, García-Cárcel L, Rubio V, Martínez C, Frigerio M, Iglesias-Pedraz JM, Espinosa A, Deng XW, Blázquez MA** (2008) Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. *Plant Journal* **53**: 324-335.
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M** (2004) Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **219**: 479-488.
- Ariizumi T, Murase K, Sun TP, Steber CM** (2008) Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in Arabidopsis by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Plant Cell* **20**: 2447-2459.
- Ariizumi T, Steber CM** (2007) Seed germination of GA-insensitive *sleepy1* mutants does not require RGL2 protein disappearance in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 791-804.
- Ariizumi T, Lawrence PK, Steber CM** (2011) The role of two f-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant Physiology* **155**: 765-775.
- Arnaud N, Girin T, Sorefan K, Fuentes S, Wood TA, Lawrenson T, Sablowski R, Ostergaard L** (2010) Gibberellins control fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Development* **24**: 2127-2132.

- Arora R, Agarwal P, Ray S, Singh AK, Singh VP, Tyagi AK, Kapoor S** (2007) *MADS-box* gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. *BMC Genomics* **8**: 242.
- Aubert D, Chevillard M, Dorne AM, Arlaud G, Herzog M** (1998) Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Molecular Biology* **36**: 871-883.
- Azcón-Bieto J, Talón M.** (2000) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
- Azcón-Bieto J, Talón M** (2008) *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
- Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY** (2012) Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Natural Cell Biology* **14**: 810-817.
- Beligni MV, Lamattina L** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221.
- Bethke PC, Libourel IG, Jones RL** (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **57**: 517-526.
- Bethke PC, Libourel IG, Reinohl V, Jones RL** (2006). Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**: 805-812.
- Bassel GW, Fung P, Chow TF, Foong JA, Provart NJ, Cutler SR** (2008) Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiology* **147**: 143-155.
- Bassel GW, Lan H, Glaab E, Gibbs DJ, Gerjets T, Krasnogor N, Bonner AJ, Holdsworth MJ, Provart NJ** (2011) Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **108**: 9709-9714.
- Baud S, Mendoza MS, To A, Harscoet E, Lepiniec L, Dubreucq B** (2007) *WRINKLED1* specifies the regulatory action of *LEAFY COTYLEDON2* towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **50**: 825-838.
- Beaudoin N, Serizet C, Gosti F, Giraudat J** (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* **12**: 1103-1115.
- Becker A, Theissen G** (2003) The major clades of *MADS-box* genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 464-489.

- Beligni MV, Lamattina L** (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221.
- Bemer M, Wolters-Arts M, Grossniklaus U, Angenent GC** (2008) The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules. *Plant Cell* **20**: 2088-2101.
- Bemer M, Heijmans K, Airoidi C, Davies B, Angenent GC** (2010) An atlas of type I MADS box gene expression during female gametophyte and seed development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 287-300.
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society* **57**, 289-300.
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M** (2006) Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **103**: 17042-17047.
- Bentsink L, Koornneef M** (2008) Seed dormancy and germination. *Arabidopsis Book* **6**: e0119.
- Bentsink L, Hanson J, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Coltrane C, Keizer P, El-Lithy M, Alonso-Blanco C, de Andres MT, Reymond M, van Eeuwijk F, Smeekens S, Koornneef M** (2010) Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **107**: 4264-4269.
- Bethke PC, Libourel IG, Jones RL** (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 517-526.
- Bewley JD, Black M** (1983) *Physiology and Biochemistry of seeds*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York. Vol. I y II.
- Bewley JD, Black M** (1994) *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York 199-272.
- Bleecker AB, Esch JJ, Hall AE, Rodriguez FI, Binder BM** (1988) The ethylene-receptor family from *Arabidopsis*: structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **353**: 1405-1412.
- Brambilla V, Battaglia R, Colombo M, Masiero S, Bencivenga S, Kater MM, Colombo L** (2007) Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 2544-56.
- Burnette WN** (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and

- radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **2**: 195-203.
- Cao D, Cheng H, Wu W, Soo HM, Peng J** (2006) Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**: 509-525.
- Cao WH, Liu J, He XJ, Mu RL, Zhou HL, Chen SY, Zhang JS** (2007) Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology* **143**: 707-719.
- Carrera E, Holman T, Medhurst A, Dietrich D, Footitt S, Theodoulou FL, Holdsworth MJ** (2007) Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **53**: 214-224.
- Castrillo G, Turck F, Leveugle M, Lecharny A, Carbonero P, Coupland G, Paz-Ares J, Oñate-Sánchez L** (2011) Speeding cis-trans regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of *Arabidopsis* transcription factors. *PLoS One* **6**.
- Chandler PM, Marion-Poll A, Ellis M, Gubler F** (2002) Mutants at the *SLENDER1* locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiology* **129**: 181-190.
- Chen JG, Pandey S, Huang J, Alonso JM, Ecker JR, Assmann SM, Jones AM** (2004) GCR1 can act independently of heterotrimeric G-protein in response to brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiology* **135**: 907-915.
- Cheng H, Qin L, Lee S, Fu X, Richards DE, Cao D, Luo D, Harberd NP, Peng J** (2004) Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**: 1055-1064.
- Chiang HH, Hwang I, Goodman HM** (1995) Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *Plant Cell* **7**: 195-201.
- Chiang GC, Barua D, Kramer EM, Amasino RM, Donohue K** (2009) Major flowering time gene, *FLOWERING LOCUS C*, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **106**: 11661-11666.
- Chiwocha SD, Cutler AJ, Abrams SR, Ambrose SJ, Yang J, Ross AR, Kermode AR** (2005) The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant Journal* **42**: 35-48.
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735-743.

- Colombo M, Masiero S, Vanzulli S, Lardelli P, Kater MM, Colombo L (2008) *AGL23*, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in Arabidopsis. *Plant Journal* **54**: 1037-1048.
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**: 462-469.
- Dai C, Xue HW (2010) Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO Journal* **29**: 1916-1927.
- Daviere JM, de Lucas M, Prat S (2008) Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Current Opinion Genetics Development* **18**: 295-303.
- Davies PJ (1985) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Davies B, Egea-Cortines M, de Andrade Silva E, Saedler H, Sommer H (1996) Multiple interactions amongst floral homeotic MADS box proteins. *EMBO Journal* **15**: 4330-4343.
- Day RC, Herridge RP, Ambrose BA, Macknight RC (2008) Transcriptome analysis of proliferating Arabidopsis endosperm reveals biological implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling, and gene expression regulation. *Plant Physiology* **148**: 1964-1984.
- de Bodt S, Raes J, Florquin K, Rombauts S, Rouze P, Theissen G, Van de Peer Y (2003) Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *Journal Molecular Evolution* **56**: 573-586.
- de Folter S, Immink RG, Kieffer M, Parenicova L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker M, Colombo L, Kater MM, Davies B, Angenent GC (2005) Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**: 1424-1433.
- de Folter S, Angenent GC (2006) trans meets cis in MADS science. *Trends Plant Science* **11**: 224-231.
- de Lucas M, Daviere JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, Prat S (2008) A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484.
- de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, Rodriguez Egea P, Bogre L, Grant M (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal* **26**: 1434-1443.
- Debeaujon I, Koornneef M (2000) Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiology* **122**: 415-424.

- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985) Efficient octopine Ti plasmid vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**: 4777- 4788.
- Dill A, Jung HS, Sun TP (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings National Academic of Science of the USA* **98**: 14162-14167.
- Dill A, Sun T (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777-785.
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM, Sun TP (2004) The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**: 1392-1405.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84.
- Dornelas MC, Patreze CM, Angenent GC, Immink RG (2011) MADS: the missing link between identity and growth? *Trends Plant Science* **16**: 89-97.
- Ellis C, Turner JG (2002) A conditionally fertile coi1 allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215**: 549-556.
- Fait A, Angelovici R, Less H, Ohad I, Urbanczyk-Wochniak E, Fernie AR, Galili G (2006) Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiology* **142**: 839-854.
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schafer E, Fu X, Fan LM, Deng XW (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475-479.
- Fernández DE, Heck GR, Perry SE, Patterson SE, Bleecker AB, Fang SC (2000) The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically. Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression. *Plant Cell* **12**: 183-198.
- Fernández-Arbaizar A, Regalado JJ, Lorenzo O (2012) Isolation and characterization of novel mutant loci suppressing the ABA hypersensitivity of the Arabidopsis coronatine insensitive 1-16 (coi1-16) mutant during germination and seedling growth. *Plant Cell Physiology* **53**: 53-63.
- Ferrario S, Busscher J, Franken J, Gerats T, Vandenbussche M, Angenent GC, Immink RG (2004) Ectopic expression of the petunia MADS box gene *UNSHAVEN* accelerates flowering and confers leaf-like characteristics to floral organs in a dominant-negative manner. *Plant Cell* **16**: 1490-1505.

- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 387-415.
- Friml J, Benkova E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jurgens G, Palme K** (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in Arabidopsis. *Cell* **108**: 661-673.
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R, Jurgens G** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis. *Nature* **426**: 147-153.
- Fu X, Richards DE, Ait-Ali T, Hynes LW, Ougham H, Peng J, Harberd NP** (2002) Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell* **14**: 3191-3200.
- Fukao T, Bailey-Serres J** (2008) Submergence tolerance conferred by Sub1A is mediated by SLR1 and SLRL1 restriction of gibberellin responses in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **105**: 16814-16819.
- Gabriele S, Rizza A, Martone J, Circelli P, Costantino P, Vittorioso P** (2010) The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3OX1*. *Plant Journal* **61**: 312-323.
- Gamboa A, Paez-Valencia J, Acevedo GF, Vazquez-Moreno L, Alvarez-Buylla RE** (2001) Floral transcription factor AGAMOUS interacts in vitro with a leucine-rich repeat and an acid phosphatase protein complex. *Biochemical Biophysical Research Communications* **288**: 1018-1026.
- Gauthier-Rouvière C, Vandromme M, Lautredou N, Cai QQ, Girard F, Fernandez A, Lamb N** (1995) The serum response factor nuclear localization signal: general implications for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in control of nuclear translocation. *Molecular and Cellular Biology* **1**: 433-44.
- Gazzarrini S, McCourt P** (2003) Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Annals of Botany* **91**: 605-612.
- Gazzarrini S, Tsuchiya Y, Lumba S, Okamoto M, McCourt P** (2004) The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in Arabidopsis through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell* **7**: 373-385.
- Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y, McCourt P** (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 1117-1126.
- Gilbert N** (2011) Local benefits: The seeds of an economy. *Nature* **474**: S18-19.

- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM (1992) Isolation of the Arabidopsis *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261.
- Gómez-Cadenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho TH, Walker-Simmons MK (1999) An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 1767-1772.
- Gómez-Cadenas A, Zentella R, Sutliff TD, Ho TH (2001). Involvement of multiple cis-elements in the regulation of GA responsive promoters: definition of a new cis-element in the *AMY32B* gene promoter of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* **112**: 211-216.
- González-García MP, Rodríguez D, Nicolás C, Rodríguez PL, Nicolás G, Lorenzo O (2003) Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination. *Plant Physiology* **133**: 135-144.
- González-García MP, Rodríguez D, Nicolás C, Nicolás G, Lorenzo O (2006) A protein phosphatase 2A from *Fagus sylvatica* is regulated by GA3 and okadaic acid in seeds and related to the transition from dormancy to germination. *Physiologia Plantarum* **128**: 153-162.
- González-Guzmán M, Apostolova N, Bellés JM, Barrero JM, Piqueras P, Ponce MR, Micol JL, Serrano R, Rodríguez PL (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell* **8**: 1833-46.
- Gramzow L, Ritz MS, Theissen G (2010) On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends Genetics* **26**: 149-153.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P, Sun TP, Thomas SG (2006) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 3399-3414.
- Gualberti G, Papi M, Bellucci L, Ricci I, Bouchez D, Camilleri C, Costantino P, Vittorioso P (2002) Mutations in the Dof zinc finger genes *DAG2* and *DAG1* influence with opposite effects the germination of Arabidopsis seeds. *Plant Cell* **14**: 1253-1263.
- Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 183-187.
- Gutiérrez L, Van Wuytswinkel O, Castelain M, Bellini C (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Science* **12**: 294-300.
- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 657-668.

- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580.
- Harada JJ** (1997) Seed maturation and control of germination. In *Advances in Cellular and Molecular Biology of Seed Development*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 545–592.
- Harada JJ** (2001) Role of Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON* genes in seed development. *Journal of Plant Physiology* **158**: 405–409.
- Harding EW, Tang W, Nichols KW, Fernandez DE, Perry SE** (2003) Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiology* **133**: 653-663.
- Hays DB, Mandel RM, Pharis RP** (2001) Hormones in zygotic and microspore embryos of *Brassica napus*. *Plant Growth Regulation* **35**, 47-58.
- He C, Saedler H** (2007) Hormonal control of the inflated calyx syndrome, a morphological novelty, in *Physalis*. *Plant Journal* **49**: 935-946.
- Heck GR, Perry SE, Nichols KW, Fernandez DE** (1995) AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos. *Plant Cell* **7**: 1271-1282.
- Hedden P, Phillips AL** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Science* **5**: 523-530.
- Helliwell CA, Sheldon CC, Olive MR, Walker AR, Zeevaart JA, Peacock WJ, Dennis ES** (1998) Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene *GA3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**: 9019-9024.
- Helliwell CA, Sullivan JA, Mould RM, Gray JC, Peacock WJ, Dennis ES** (2001) A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant Journal* **28**: 201-208.
- Henry YA, B Ducastel, A Guissani** (1997) Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. *Biomed. Publ, Austin*, 15-46.
- Henschel K, Kofuji R, Hasebe M, Saedler H, Munster T, Theissen G** (2002) Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 801-814.
- Heo JO, Chang KS, Kim IA, Lee MH, Lee SA, Song SK, Lee MM, Lim J** (2011) Funneling of gibberellin signaling by the GRAS transcription regulator scarecrow-like 3 in the Arabidopsis root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **108**: 2166-2171.
- Hepworth SR, Valverde F, Ravenscroft D, Mouradov A, Coupland G** (2002) Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO Journal* **21**: 4327-4337.

- Hirano K, Asano K, Tsuji H, Kawamura M, Mori H, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M (2010) Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell* **22**: 2680-2696.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* **179**: 33-54.
- Hou X, Lee LY, Xia K, Yan Y, Yu H (2010) DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental Cell* **19**: 884-894.
- Hu J, Mitchum MG, Barnaby N, Ayele BT, Ogawa M, Nam E, Lai WC, Hanada A, Alonso JM, Ecker JR, Swain SM, Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun T (2008) Potential sites of bioactive gibberellin production during reproductive growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**: 320-336.
- Huang H, Mizukami Y, Hu Y, Ma H (1993) Isolation and characterization of the binding sequences for the product of the Arabidopsis floral homeotic gene *AGAMOUS*. *Nucleic Acids Research* **21**: 4769-4776.
- Ikeda M, Umehara M, Kamada H (2006) Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* **23**: 153–161.
- Immink RG, Tonaco IA, de Folter S, Shchennikova A, van Dijk AD, Busscher-Lange J, Borst JW, Angenent GC (2009) SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology* **10**: R24.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**: 249-264.
- Isabel-LaMoneda I, Diaz I, Martinez M, Mena M, Carbonero P (2003) SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like thiol protease gene in the aleurone of germinating seeds. *Plant Journal* **2**:329-40.
- Ito J, Batth TS, Petzold CJ, Redding-Johanson AM, Mukhopadhyay A, Verboom R, Meyer EH, Millar AH, Heazlewood JL (2011) Analysis of the Arabidopsis Cytosolic Proteome Highlights Subcellular Partitioning of Central Plant Metabolism. *Journal of Proteome Research* **4**: 1571-82.
- Itoh H, Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Kamiya N, Hasegawa Y, Ashikari M, Matsuoka M (2005) Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant Journal* **44**: 669-679.
- Jacobsen SE, Olszewski NE (1993) Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**: 887-896.

- Jenik PD, Gillmor CS, Lukowitz W** (2007) Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. Annual Review of Cell and Developmental Biology **23**: 207-236.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO Journal **6**: 3901-3907.
- Kapazoglou A, Engineer C, Drosou V, Kalloniati C, Tani E, Tsaballa A, Kouri ED, Ganopoulos I, Flemetakis E, Tsaftaris AS** (2012) The study of two barley type I-like MADS-box genes as potential targets of epigenetic regulation during seed development. BMC Plant Biology **12**: 166.
- Kagaya Y, Okuda R, Ban A, Toyoshima R, Tsutsumida K, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005) Indirect ABA-dependent regulation of seed storage protein genes by FUSCA3 transcription factor in Arabidopsis. Plant Cell Physiology **46**: 300-311.
- Kagaya Y, Toyoshima R, Okuda R, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005) LEAFY COTYLEDON1 controls seed storage protein genes through its regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. Plant Cell Physiology **46**: 399-406.
- Kang IH, Steffen JG, Portereiko MF, Lloyd A, Drews GN** (2008) The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in Arabidopsis. Plant Cell **20**: 635-647.
- Kanno Y, Jikumaru Y, Hanada A, Nambara E, Abrams SR, Kamiya Y, Seo M** (2010) Comprehensive hormone profiling in developing Arabidopsis seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. Plant Cell Physiology **51**: 1988-2001.
- Karssen C, Brinkhorst-van der Swan DCL, Breekland AE** (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Planta **157**: 158-165.
- Kaufmann K, Melzer R, Theissen G** (2005) MIKC-type MADS domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. Gene **347**: 183-98.
- Kaufmann K, Muiño JM, Jauregui R, Airoidi CA, Smaczniak C, Krajewski P, Angenent GC** (2009) Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower. PLoS Biology **4**: 7.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR** (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. Cell **72**: 427-441.

- Kim DH, Yamaguchi S, Lim S, Oh E, Park J, Hanada A, Kamiya Y, Choi G (2008) SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in Arabidopsis, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell* **5**: 1260-77.
- Klein TM, Fromm M, Weissinger A, Tomes D, Schaaf S, Sletten M, Sanford JC (1987) High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 70-73.
- Kliebenstein DJ, Kroymann J, Brown P, Figuth A, Pedersen D, Gershenzon J, Mitchell-Olds T (2001) Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. *Plant Physiology* **126**: 811-825.
- Ko JH, Yang SH, Han KH (2006) Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant Journal* **47**: 343-355.
- Kohler C, Hennig L, Spillane C, Pien S, Gruissem W, Grossniklaus U (2003) The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes Development* **17**: 1540-1553.
- Koornneef M, van der Veen JH (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* **58**: 257-263.
- Koornneef M, Dellaert LW, van der Veen JH (1982) EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutation Research* **93**: 109-123.
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Blankestijn-de Vries H, Hanhart C J, Peeters AJ (1998) Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **148**: 885-892.
- Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F (2003) Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. *Development* **130**: 6065-6073.
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO Journal* **23**: 1647-1656.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **5259**: 680-5.
- Laux T, Wurschum T, Breuninger H (2004) Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* **16 Suppl**: S190-202.
- Le BH, Cheng C, Bui AQ, Wagmaister JA, Henry KF, Pelletier J, Kwong L, Belmonte M, Kirkbride R, Horvath S, Drews GN, Fischer RL, Okamuro JK, Harada JJ, Goldberg RB (2010) Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development

- and identification of seed-specific transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **107**: 8063-8070.
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP, Peng J** (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via *RGL2*, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development* **5**: 646-58.
- Lee J, Yoo SJ, Park SH, Hwang I, Lee JS, Ahn JH** (2007) Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **4**: 397–402.
- Lee J, Oh M, Park H, Lee I** (2008) SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant Journal* **55**: 832-843.
- Lee KP, Piskurewicz U, Tureckova V, Strnad M, Lopez-Molina L** (2010). A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **107**: 19108–19113.
- Lehti-Shiu MD, Adamczyk BJ, Fernandez DE** (2005) Expression of MADS-box genes during the embryonic phase in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **58**: 89-107.
- Leon-Kloosterziel KM, Keijzer CJ, Koornneef M** (1994) A Seed Shape Mutant of Arabidopsis That Is Affected in Integument Development. *Plant Cell* **6**: 385-392.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M** (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 405-430.
- Leubner-Metzger G** (2006) Hormonal interactions during seed dormancy release and germination. In: Basra A, ed. *Handbook of seed science and technology*. Binghamton, NY, USA: The Haworth Press, 303–342.
- Leung J, Giraudat J** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **49**: 199-222.
- Li J, Jin H** (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant Science* **12**: 37-41.
- Li Q, Wang BC, Xu Y, Zhu YX** (2007) Systematic studies of 12S seed storage protein accumulation and degradation patterns during Arabidopsis seed maturation and early seedling germination stages. *Journal Biochemistry and Molecular Biology* **40**: 373-381.
- Libourel IG, Bethke PC, De Michele R, Jones RL** (2006) Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* **223**: 813-820.

- Linkies A, Muller K, Morris K, Tureckova V, Wenk M, Cadman CS, Corbineau F, Strnad M, Lynn JR, Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2009) Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**: 3803-3822.
- Linkies A, Schuster-Sherpa U, Tintelnot S, Leubner-Metzger G, Muller K** (2010) Peroxidases identified in a subtractive cDNA library approach show tissue-specific transcript abundance and enzyme activity during seed germination of *Lepidium sativum*. *Journal Experimental Botany* **61**: 491-502.
- Liu PP, Koizuka N, Martin RC, Nonogaki H** (2005) The BME3 (Blue Micropylar End 3) GATA zinc finger transcription factor is a positive regulator of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Journal* **44**: 960-971.
- Liu Y, Koornneef M, Soppe W** (2007) The absence of histone H2B monoubiquitination in the *Arabidopsis hub1 (rdo4)* mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *Plant Cell* **19**: 433-444.
- Liu Y, Wu R, Wan Q, Xie G, Bi Y** (2007) Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant Cell Physiology* **48**: 511-522.
- Liu C, Chen H, Er HL, Soo HM, Kumar PP, Han JH, Liou YC, Yu H** (2008) Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in *Arabidopsis*. *Development* **135**: 1481-1491.
- Liu J, Xu B, Hu L, Li M, Su W, Wu J, Yang J, Jin Z** (2009) Involvement of a banana MADS-box transcription factor gene in ethylene-induced fruit ripening. *Plant Cell Reports* **28**: 103-111.
- Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J** (2010) H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2979-2990.
- Liu Z, Mara C** (2010) Regulatory mechanisms for floral homeotic gene expression. *Seminars in Cell Developmental Biology* **21**: 80-86.
- López-Molina L, Mongrand S, Chua NH** (2001) A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**: 4782-4787.
- Lorenzo O, Rodríguez D, Nicolás G, Rodríguez PL, Nicolás C** (2001) A new protein phosphatase 2C (FsPP2C1) induced by abscisic acid is specifically expressed in dormant beechnut seeds. *Plant Physiology* **125**: 1949-1956.

- Lorenzo O, Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D (2002) Molecular cloning of a functional protein phosphatase 2C (FsPP2C2) with unusual features and synergistically up-regulated by ABA and calcium in dormant seeds of *Fagus sylvatica*. *Physiologia Plantarum* **114**: 482-490.
- Lorenzo O, Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D (2002) GA(3)-induced expression of a new functional AAA-ATPase (FsA1) is correlated with the onset of germination in *Fagus sylvatica* L. seeds (beechnuts). *Plant Cell Physiology* **43**: 27-34.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165-178.
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West MA, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195-1205.
- Lovegrove A, Hooley R (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Science* **5**: 102-110.
- Lu P, Porat R, Nadeau JA, O'Neill SD (1996) Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* **8**: 2155-2168.
- Lukowitz W, Mayer U, Jurgens G (1996) Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related *KNOLLE* gene product. *Cell* **84**: 61-71.
- Macquet A, Ralet MC, Kronenberger J, Marion-Poll A, North HM (2007) In situ, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiology* **48**: 984-999.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K (2004) *dwarf* and *delayed-flowering 1*, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant Journal* **37**: 720-729.
- Manz B, Müller K, Kucera B, Volke F, Leubner-Metzger G (2005) Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* **138**: 1538-1551.
- Martínez-Andújar C, Martín RC, Nonogaki H (2012) Seed traits and genes important for translational biology--highlights from recent discoveries. *Plant Cell Physiology* **53**: 5-15.
- Masiero S, Imbriano C, Ravasio F, Favaro R, Pelucchi N, Gorla MS, Mantovani R, Colombo L, Kater MM (2002) Ternary complex formation between MADS-box transcription factors and the histone fold protein NF-YB. *Journal Biological Chemistry* **277**: 26429-26435.

- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun TP, Steber CM** (2003) The Arabidopsis *SLEEPY1* gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120-1130.
- McGonigle B, Bouhidel K, Irish VF** (1996) Nuclear localization of the Arabidopsis APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes Development* **10**: 1812-1821.
- Melan MA, Dong X, Endara ME, Davis KR, Ausubel FM, Peterman TK** (1993) An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* **101**: 441-450.
- Melzer R, Wang YQ, Theissen G** (2010) The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *Seminars Cell Developmental Biology* **21**: 118-128.
- Mena M, Cejudo FJ, Isabel-Lamonedá I, Carbonero P** (2002) A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone. *Plant Physiology* **130**: 111-119.
- Messenguy F, Dubois E** (2003) Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* **316**: 1-21.
- Michael TP, Breton G, Hazen SP, Priest H, Mockler TC, Kay SA, Chory J** (2008) A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biology* **6**: e225.
- Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F** (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant Journal* **45**: 942-954.
- Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP** (2006) Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant Journal* **45**: 804-818.
- Moreno-Risueño MA, Diaz I, Carrillo L, Fuentes R, Carbonero P** (2007) The HvDOF19 transcription factor mediates the abscisic acid-dependent repression of hydrolase genes in germinating barley aleurone. *Plant Journal* **51**: 352-365.
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-463.
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 437-497.
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E** (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal* **41**: 697-709.

- Nakabayashi R, Yamazaki M, Saito K** (2010) A polyhedral approach for understanding flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *New Biotechnology* **27**: 829-836.
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Kato E, Iuchi S, Kobayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I** (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant Journal* **46**: 880-889.
- Nam J, Kim J, Lee S, An G, Ma H, Nei M** (2004) Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**: 1910-1915.
- Nambara E., Akazawa T., McCourt P** (1991). Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazol on mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **97**, 736-738.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science* **8**: 213-217.
- Nambara E, Nonogaki H** (2012) Seed biology in the 21st century: perspectives and new directions. *Plant Cell Physiology* **53**: 1-4.
- Nonogaki H** (2008) Repression of transcription factors by microRNA during seed germination and postgermination: Another level of molecular repression in seeds. *Plant Signal Behavior* **3**: 65-67.
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-1604.
- Oh E, Kim J, Park E, Kim JI, Kang C, Choi G** (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 3045–3058.
- Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, Hirai N, Kamiya Y, Koshiba T, Nambara E** (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**: 97-107.
- Okamoto M, Tatematsu K, Matsui A, Morosawa T, Ishida J, Tanaka M, Endo TA, Mochizuki Y, Toyoda T, Kamiya Y, Shinozaki K, Nambara E, Seki M** (2010) Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in dry and imbibed seeds of *Arabidopsis* using tiling arrays. *Plant Journal* **62**: 39-51.
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F** (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**: S61-80.
- Oñate-Sánchez L, Vicente-Carbajosa J** (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes* **1**, 93.

- Oyama T, Shimura Y, Okada K** (1997) The Arabidopsis *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes & Development* **11**: 2983-2995.
- Papaefthimiou D, Kapazoglou A, Tsaftaris AS** (2012) Cloning and characterization of SOC1 homologs in barley (*Hordeum vulgare*) and their expression during seed development and in response to vernalization. *Physiologia Plantarum* **146**: 71-85.
- Parcy F** (2005) Flowering: a time for integration. *The International Journal of Developmental Biology* **49**: 585-593.
- Parenicová L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC, Colombo L** (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in Arabidopsis: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**: 1538-1551.
- Parker RE** (1989) Utilización de la chi-cuadrado. *Estadística para biólogos*. Ediciones Omega, Barcelona, 41-59.
- Peeters AJ, Blankestijn-De Vries H, Hanhart CJ, Leon-Kloosterziel KM, Zeevaart JA, Koornneef M** (2002) Characterization of mutants with reduced seed dormancy at two novel *RDO* loci and a further characterization of *rdo1* and *rdo2* in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **115**: 604-612.
- Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA** (2006) Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* **18**: 1887-1899.
- Penfield S, Hall A** (2009) A role for multiple circadian clock genes in the response to signals that break seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**: 1722-1732.
- Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, Harberd NP** (1997) The Arabidopsis *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* **11**: 3194-3205.
- Peng J, Harberd NP** (2002) The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 376-381.
- Perbal MC, Haughn G, Saedler H, Schwarz-Sommer Z** (1996) Non-cell-autonomous function of the Antirrhinum floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* **122**: 3433-3441.
- Perry SE, Lehti MD, Fernandez DE** (1999) The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins. *Plant Physiology* **120**: 121-130.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NE, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P** (1995) Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from Arabidopsis. *Plant Physiology* **108**: 1049-1057.

- Pirrello J, Jaimes-Miranda F, Sanchez-Ballesta MT, Tournier B, Khalil-Ahmad Q, Regad F, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (2006)** Sl-ERF2, a tomato ethylene response factor involved in ethylene response and seed germination. *Plant Cell Physiology* **47**: 1195-1205.
- Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L (2008)** The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20**: 2729-2745.
- Piskurewicz U, Tureckova V, Lacombe E, Lopez-Molina L (2009)** Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO Journal* **28**: 2259-2271.
- Portereiko MF, Lloyd A, Steffen JG, Punwani JA, Otsuga D, Drews GN (2006)** AGL80 is required for central cell and endosperm development in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 1862-1872.
- Preston J, Tatematsu K, Kanno Y, Hobo T, Kimura M, Jikumaru Y, Yano R, Kamiya Y, Nambara E (2009)** Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiology* **50**: 1786-1800.
- Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D (2004)** The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* **134**: 1598-1613.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SP, Belghazi M, Job C, Job D (2008)** Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology* **148**: 620-641.
- Raz V, Bergervoet JH, Koornneef M (2001)** Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development* **128**: 243-252.
- Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y (2003)**. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* **19**: 368-375.
- Ren D, Liu Y, Yang K.-Y, Han L, Mao G, Glazebrook J, Zhang S (2008)** A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **105**: 5638–5643.
- Reyes D, Rodríguez D, González-García MP, Lorenzo O, Nicolás G, García-Martínez JL, Nicolás C (2006)**. Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in Arabidopsis shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **141**: 1414-1424.

- Richards DE, King KE, Ait-Ali T, Harberd NP** (2001) HOW GIBBERELLIN REGULATES PLANT GROWTH AND DEVELOPMENT: A Molecular Genetic Analysis of Gibberellin Signaling. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* **52**: 67-88.
- Riechmann JL, Wang M, Meyerowitz EM** (1996) DNA-binding properties of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acids Research* **24**: 3134-3141.
- Rieu I, Ruiz-Rivero O, Fernández-García N, Griffiths J, Powers SJ, Gong F, Linhartova T, Eriksson S, Nilsson O, Thomas SG, Phillips AL, Hedden P** (2008) The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20OX1* and *AtGA20OX2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle. *Plant Journal* **53**: 488-504.
- Rock CD** (1999) Dominant Wilty mutants of *Zea mays* (Poaceae) are not impaired in abscisic acid perception or metabolism. *American Journal of Botany* **86**: 1796-1800.
- Rohde A, Kurup S, Holdsworth M** (2000) ABI3 emerges from the seed. *Trends Plant Science* **5**: 418-419.
- Roman G, Lubarsky B, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR** (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* **3**: 1393:409.
- Roxrud I, Lid SE, Fletcher JC, Schmidt ED, Opsahl-Sorteberg HG** (2007) GASA4, one of the 14-member Arabidopsis GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiology* **48**: 471-483.
- Rubinovich L, Weiss D** (2010) The Arabidopsis cysteine-rich protein GASA4 promotes GA responses and exhibits redox activity in bacteria and in planta. *Plant Journal* **64**: 1018-1027.
- Saavedra X, Modrego A, Rodríguez D, González-García MP, Sanz L, Nicolás G, Lorenzo O** (2010) The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. *Plant Physiology* **152**: 133-150.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J** (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**: 374-378.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs,

- transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **290**: 998-1009.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos-Mendoza M, Dubreucq B, Baud S, Parcy F, Caboche M, Lepiniec L** (2008) Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **54**: 608-620.
- Sarath G, Bethke PC, Jones R, Baird LM, Hou G, Mitchell RB** (2006) Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta* **223**: 1154-1164.
- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M** (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**: 1896-1898.
- Satler SO, Kende H** (1985) Ethylene and the growth of rice seedlings. *Plant Physiology* **79**: 194-198.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* **37**: 501-506.
- Schneider B, Schutte HR, Tewes A** (1984) Comparative Investigations on the Metabolism of 2-(2,4-Dichlorophenoxy)Isobutyric Acid in Plants and Cell Suspension Cultures of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiology* **76**: 989-992.
- Schomberg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JAD, Amasino RA** (2003) Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell* **15**: 151-163.
- Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P, Flor PJ, Hansen R, Tetens F, Lonnig WE, Saedler H, Sommer H** (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 Journal* **11**: 251-263.
- Schwartz BW, EC Y, DW M** (1994) Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal suspensor mutants of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 3235-3245.
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E** (2006) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant Journal* **48**: 354-366.

- Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology* **69**: 463-472.
- Sharrocks AD, Shore P (1995) DNA bending in the ternary nucleoprotein complex at the c-fos promoter. *Nucleic Acids Research* **13**: 2442-2449.
- Shen YY, Zhang DP, Chen SW, Peng YB (2001). Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2097-2103.
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor *GID1*. *Nature* **456**: 520-523.
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M (1994) The Induction of Seed Germination in *Arabidopsis thaliana* Is Regulated Principally by Phytochrome B and Secondarily by Phytochrome A. *Plant Physiology* **104**: 363-371.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 217-223.
- Shiraishi H, Okada K, Shimura Y (1993) Nucleotide sequences recognized by the AGAMOUS MADS domain of *Arabidopsis thaliana in vitro*. *Plant Journal* **4**: 385-398.
- Shore P, Sharrocks AD (1995) The MADS-box family of transcription factors. *European Journal of Biochemistry* **229**: 1-13.
- Sieburth LE, Drews GN, Meyerowitz EM (1998) Non-autonomy of AGAMOUS function in flower development: use of a Cre/loxP method for mosaic analysis in *Arabidopsis*. *Development* **125**: 4303-4312.
- Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun T (1998) The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155-169.
- Silverstone AL, Tseng TS, Swain SM, Dill A, Jeong SY, Olszewski NE, Sun TP (2007) Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **143**: 987-1000.
- Smaczniak C, Immink RG, Angenent GC, Kaufmann K (2012) Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* **139**: 3081-3098.
- Spencer MW, Casson SA, Lindsey K (2007) Transcriptional profiling of the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiology* **143**: 924-940.
- Sridhar GR, Lakshmi PV, Rao AA (2006) Phylogenetic tree construction of butyrylcholinesterase sequences in life forms. *Journal of the Associations Physicians of India* **54**: 122-123.

- Staswick PE, Su W, Howell SH** (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **89**: 6837-6840.
- Steber CM, Cooney SE, McCourt P** (1998) Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of ABI1-1 in *Arabidopsis thaliana*. Genetics **149**: 509-521.
- Steber CM, McCourt P** (2001) A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. Plant Physiology **125**: 763-769.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **98**: 11806-11811.
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong LW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh TF, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ** (2008) Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON2* induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **105**: 3151-3156.
- Strader LC, Ritchie S, Soule JD, McGinnis KM, Steber CM** (2004) Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene *SLEEPY1* are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **101**: 12771-12776.
- Subbiah V, Reddy KJ** (2010) Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in Arabidopsis. Journal of Bioscience **35**: 451-458.
- Sun TP, Kamiya Y** (1994) The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. Plant Cell **6**: 1509-1518.
- Sun TP, Gubler F** (2004) Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annual Review of Plant Biology **55**: 197-223.
- Sun TP** (2008) Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in Arabidopsis. Arabidopsis Book **6**: e0103.
- Sun TP** (2011) The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. Current Biology **21**: R338-345.
- Tardif G, Kane NA, Adam H, Labrie L, Major G, Gulick P, Sarhan F, Laliberte JF** (2007) Interaction network of proteins associated with abiotic stress response and development in wheat. Plant Molecular Biology **63**: 703-718.
- Taiz L, Zliger E** (2010) Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland 5^a Ed.
- Thakare D, Tang W, Hill K, Perry SE** (2008) The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in Arabidopsis and soybean. Plant Physiology **146**: 1663-1672.

- Thomas SG, Phillips AL, Hedden P** (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 4698-4703.
- Tian Q, Uhlir NJ, Reed JW** (2002) Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* **14**: 301–319.
- To A, Valon C, Savino G, Guilleminot J, Devic M, Giraudat J, Parcy F** (2006) A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *Plant Cell* **18**: 1642-1651.
- Torres-Ruiz RA, Jurgens G** (1994) Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in Arabidopsis development. *Development* **120**: 2967-2978.
- Toufighi K, Brady SM, Austin R, Ly E, Provart NJ** (2005) The Botany Array Resource: e-Northerns, Expression Angling, and promoter analyses. *Plant Journal* **43**: 153-163.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **76**: 4350-4354.
- Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen RA, Coupland G, Colot V** (2007) Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genetics* **3**: e86.
- Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK** (2004) Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *Journal of Biomedicine Biotechnology* **2004**: 227-237
- Úbeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GT, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ** (2008) Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Natural Cell Biology* **10**: 625-628.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YI, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* **437**: 693-698.
- Ueguchi-Tanaka M, Hirano K, Hasegawa Y, Kitano H, Matsuoka M** (2008) Release of the repressive activity of rice DELLA protein SLR1 by gibberellin does not require SLR1 degradation in the *gid2* mutant. *Plant Cell* **20**: 2437-2446.
- Urbanus SL, Martinelli AP, Dinh QD, Aizza LC, Dornelas MC, Angenent GC, Immink RG** Intercellular transport of epidermis-expressed MADS domain transcription

- factors and their effect on plant morphology and floral transition. *Plant J* **63**: 60-72.
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermel S, Weiss D, Pichersky E** (2007) Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**: 32-45.
- Verelst W, Twell D, de Folter S, Immink R, Saedler H, Munster T** (2007) MADS-complexes regulate transcriptome dynamics during pollen maturation. *Genome Biology* **8**: R249.
- Vernon DM, Meinke DW** (1994) Embryogenic transformation of the suspensor in *twin*, a polyembryonic mutant of Arabidopsis. *Developmental Biology* **165**: 566-573.
- Veron AS, Kaufmann K, Bornberg-Bauer E** (2007) Evidence of interaction network evolution by whole-genome duplications: a case study in MADS-box proteins. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 670-678.
- Vicente-Carbajosa J, Carbonero P** (2005) Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *International Journal of Developmental Biology* **49**: 645-651.
- Wagner D, Sablowski RW, Meyerowitz EM** (1999) Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* **285**, 582-584.
- Wang H, Caruso LV, Downie AB, Perry SE** (2004) The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *Plant Cell* **5**: 1206-19.
- Wang Y, Liu C, Li K, Sun F, Hu H, Li X, Zhao Y, Han C, Zhang W, Duan Y, Liu M, Li X** (2007) Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. *Plant Molecular Biology* **64**, 633-644.
- Wang L, Xie W, Chen Y, Tang W, Yang J, Ye R, Liu L, Lin Y, Xu C, Xiao J, Zhang J** (2010) A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice. *Plant Journal* **61**, 752-766.
- Weijers D, Jurgens G** (2005) Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 32-37.
- Wen CK, Chang C** (2002) Arabidopsis *RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**: 87-100.
- Wettenhall JM, Simpson KM, Satterley K, Smyth GK** (2006). affyImGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. *Bioinformatics* **22**, 897-899.

- Wilens RW, van Rooijen GJ, Pearce DW, Pharis RP, Holbrook LA, Moloney MM (1991) Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in brassica and linum oilseeds. *Plant Physiology* **95**: 399-405.
- Willemsen V, Wolkenfelt H, de Vrieze G, Weisbeek P, Scheres B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **125**: 521-531.
- Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C (2007) The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209-1220.
- Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology* **100**: 403-408.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**: e718.
- Yadegari R, Paiva G, Laux T, Koltunow AM, Apuya N, Zimmerman JL, Fischer RL, Harada JJ, Goldberg RB (1994) Cell differentiation and morphogenesis are uncoupled in *Arabidopsis* raspberry embryos. *Plant Cell* **6**: 1713-1729.
- Yamaguchi S, Smith MW, Brown RG, Kamiya Y, Sun T (1998) Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* **10**: 2115-2126.
- Yamaguchi S, Sun T, Kawaide H, Kamiya Y (1998) The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology* **116**: 1271-1278.
- Yamaguchi N, Suzuki M, Fukaki H, Morita-Terao M, Tasaka M, Komeda Y (2007) CRM1/BIG-mediated auxin action regulates *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell Physiology* **48**: 1275-1290.
- Yamamoto A, Kagaya Y, Usui H, Hobo T, Takeda S, Hattori T (2010) Diverse roles and mechanisms of gene regulation by the *Arabidopsis* seed maturation master regulator FUS3 revealed by microarray analysis. *Plant Cell Physiology* **51**: 2031-2046.
- Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2004) Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* **16**: 367-378.
- Yamauchi Y, Takeda-Kamiya N, Hanada A, Ogawa M, Kuwahara A, Seo M, Kamiya Y, Yamaguchi S (2007) Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the

- suppression of germination of dark-imbibed *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiology* **48**: 555-561.
- Yano R, Kanno Y, Jikumaru Y, Nakabayashi K, Kamiya Y, Nambara E** (2009) CHOTTO1, a putative double APETALA2 repeat transcription factor, is involved in abscisic acid-mediated repression of gibberellin biosynthesis during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **151**: 641-654.
- Yeung EC, Meinke DW** (1993) Embryogenesis in Angiosperms: development of the suspensor. *Plant Cell* **5**: 1371-1381.
- Yin LL, Xue HW** The MADS29 transcription factor regulates the degradation of the nucellus and the nucellar projection during rice seed development. *Plant Cell* **24**: 1049-1065.
- Yoo SK, Lee JS, Ahn JH** (2006) Overexpression of AGAMOUS-LIKE 28 (AGL28) promotes flowering by upregulating expression of floral promoters within the autonomous pathway. *Biochemical Biophysical Research Communications* **348**: 929-936.
- Young KH** (1998) Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. *Biology of Reproduction* **58**, 302-311.
- Young TE, Gallie DR** (2000) Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* **42**: 397-414.
- Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y, Sun TP** (2007) Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 3037-3057.
- Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J, Jacobsen SE** (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* **5**: e129.
- Zhang ZL, Ogawa M, Fleet CM, Zentella R, Hu J, Heo JO, Lim J, Kamiya Y, Yamaguchi S, Sun TP** (2011) Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **108**: 2160-2165.
- Zhang Z, Li H, Zhang D, Liu Y, Fu J, Shi Y, Song Y, Wang T, Li Y** (2012) Characterization and expression analysis of six MADS-box genes in maize (*Zea mays* L.). *Journal Plant Physiology* **169**: 797-806.
- Zheng Y, Ren N, Wang H, Stromberg AJ, Perry SE** (2009) Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUSLike15. *Plant Cell* **21**: 2563-2577.
- Zobell O, Faigl W, Saedler H, Munster T** (2010) MIKC* MADS-box proteins: conserved regulators of the gametophytic generation of land plants. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 1201-1211.