

**Caracterización genética y molecular  
de *SWC6*, *SWC4* y *YAF9*, componentes  
del complejo remodelador de cromatina  
*SWR1* que participa en el control de la  
transición floral en *Arabidopsis thaliana***



Tesis doctoral  
Ángeles Gómez Zambrano  
Madrid, 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Caracterización genética y molecular de *SWC6*, *SWC4* y  
*YAF9*, componentes del complejo remodelador de  
cromatina *SWR1* que participa en el control de la  
transición floral en *Arabidopsis thaliana***

TESIS DOCTORAL  
ÁNGELES GÓMEZ ZAMBRANO  
MADRID, 2013





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Caracterización genética y molecular de *SWC6*, *SWC4* y  
*YAF9*, componentes del complejo remodelador de  
cromatina *SWR1* que participa en el control de la  
transición floral en *Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada por Ángeles Gómez Zambrano para optar al grado de Doctor por la  
Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Trabajo realizado en el Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de  
Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) bajo la dirección de los  
Doctores José Antonio Jarillo Quiroga y Manuel Piñeiro Galván.

VºBº DE LOS DIRECTORES

VºBº TUTOR

DOCTORANDA

J.A. JARILLO    M. PIÑEIRO

FRANCISCO LEGANÉS

ÁNGELES GÓMEZ

TESIS DOCTORAL  
ÁNGELES GÓMEZ ZAMBRANO  
MADRID, 2013



***A mis padres***



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	5
<b>SUMMARY</b>	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	9
1. LA TRANSICIÓN FLORAL	9
2. EL CONTROL GENÉTICO DE LA FLORACIÓN EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	10
2.1. Variación genética natural	10
2.2. Variación genética inducida	12
2.2.1. Rutas inductoras de la floración	12
▪ Ruta del fotoperiodo	13
▪ Ruta de vernalización	17
▪ Ruta dependiente de la temperatura ambiental	23
▪ Ruta autónoma	25
▪ Ruta de giberelinas	28
▪ Ruta dependiente de la edad	31
3. REGULACIÓN DE LA FLORACIÓN MEDIADA POR LOS INTEGRADORES FLORALES	32
3.1. Los integradores florales <i>FT</i> y <i>TSF</i>	32
3.2. El Integrador floral <i>SOC1</i>	34
3.3. El Integrador floral <i>AGAMOUS-LIKE 24</i>	35
3.4. El Integrador floral <i>LEAFY</i>	35
4. REPRESIÓN DE LA FLORACIÓN	38
4.1. Integración de los represores florales en las distintas rutas inductoras de la floración	38
4.2. Represión de la floración dependiente de modificaciones a nivel epigenético	41
4.2.1. Activación de la expresión de <i>FLC</i>	41
4.2.2. Otros represores florales implicados en mecanismos de remodelación de la cromatina	45
5. EL COMPLEJO <i>SWR1</i> DE <i>ARABIDOPSIS</i> Y SU IMPLICACIÓN EN DIFERENTES ASPECTOS DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS	48
<b>OBJETIVOS</b>	57
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	61
1. Fondos genéticos y material vegetal	63
2. Condiciones de crecimiento de las plantas	64
3. Análisis fenotípico	65
3.1. Medida del tiempo de floración	65
3.2. Medida de las fases del desarrollo vegetativo	66



3.3. Medidas de caracteres morfológicos	66
3.4. Medida del crecimiento de la raíz principal	66
3.5. Cuantificación del número de células	66
3.6. Montaje de preparaciones de anteras para microscopía de fluorescencia	67
3.7. Tinción de Alexander	67
3.8. Extracción y cuantificación de clorofilas	67
4. Ensayos de Citometría de flujo	68
5. Análisis genéticos	68
5.1. Métodos de manipulación y análisis de DNA genómico vegetal	68
6. Obtención de líneas de dobles mutantes	69
7. Obtención de construcciones plasmídicas	69
7.1. Análisis de los promotores de <i>SWC6</i> , <i>SWC4</i> y <i>YAF9A</i> en plantas transgénicas	69
7.2. Clonación de los cDNAs que codifican las proteínas completas y/o fragmentos de estos cDNAs para <i>SWC6</i> , <i>SWC4</i> , <i>YAF9A</i> y <i>YAF9B</i>	70
8. Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
9. Métodos histoquímicos	73
9.1. Ensayos histoquímicos de la actividad $\beta$ -glucuronidasa	73
10. Análisis de Expresión	73
10.1. Extracción de RNA	73
10.2. Análisis de expresión del RNA mensajero	73
10.3. Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos	76
11. Análisis de doble híbrido	77
12. Ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en plantas	78
13. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	78
14. Ensayos de inmunoprecipitación (pull-down)	79
15. Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a histonas de Arabidopsis	79
15.1. Extracción de las histonas de células de Arabidopsis en cultivo	79
15.2. Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a histonas	80
16. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	80
<b>RESULTADOS</b>	<b>83</b>
1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN ORTÓLOGO <i>SWC6</i> DE ARABIDOPSIS	85
1.1. Caracterización genética y molecular de <i>SWC6</i> en Arabidopsis	85
1.2. Análisis del patrón de expresión de <i>SWC6</i>	86
1.3. Caracterización fenotípica de un alelo de pérdida de función para <i>SWC6</i>	88
1.4. Análisis de expresión de genes de floración en mutantes <i>swc6-1</i>	91
1.5. Análisis genético de la interacción entre el gen <i>SWC6</i> con genes de la ruta autónoma y alelos activos de <i>FRI</i>	92
1.6. Interacción genética de los loci <i>SWC6</i> y <i>ESD1/ARP6</i> e interacción física de las proteínas que codifican	95

1.7. SWC6 es necesario para la activación de la transcripción de <i>FLC</i> a través de mecanismos de acetilación y metilación de histonas	98
1.8. Interacción genética de <i>SWC6</i> y <i>SDG8/EFS</i> , una metiltransferasa de histonas reclutada por el Complejo PAF1	101
<b>2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN <i>SWC4</i> DE ARABIDOPSIS</b>	<b>105</b>
2.1. Caracterización genética y molecular de <i>SWC4</i> en Arabidopsis	105
2.2. Análisis del patrón de expresión de <i>SWC4</i>	107
2.3. La pérdida total de función de <i>SWC4</i> provoca letalidad en plantas de Arabidopsis	109
2.4. Caracterización fenotípica de plantas con <i>SWC4</i> silenciado	114
2.4.1. Las plantas con <i>SWC4</i> silenciado presentan alteraciones pleiotrópicas del fenotipo que afectan a caracteres vegetativos y reproductivos	117
2.5. Análisis de la expresión de genes de floración en plantas <i>swc4i 712</i>	122
2.6. Análisis del tamaño y la proliferación celular de plantas con <i>SWC4</i> silenciado	124
2.7. Caracterización fenotípica de plantas sobreexpresoras de <i>SWC4</i>	129
2.8. Ensayos de unión de <i>SWC4</i> a extractos de histonas de Arabidopsis	134
<b>3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE POSIBLES ORTÓLOGOS DE <i>YAF9</i> EN ARABIDOPSIS</b>	<b>137</b>
3.1. Caracterización genética y molecular de <i>YAF9</i> en Arabidopsis	137
3.2. Análisis del patrón de expresión de <i>YAF9A</i> y <i>YAF9B</i>	141
3.3. Caracterización fenotípica y molecular de los mutantes de pérdida de función para <i>YAF9A</i> y <i>YAF9B</i>	146
3.3.1. Análisis de las alteraciones fenotípicas causadas por la pérdida de función conjunta de <i>YAF9A</i> y de <i>YAF9B</i>	148
3.3.2. Análisis de expresión de genes de floración en mutantes <i>yaf9a yaf9b</i>	153
3.3.3. Análisis del tamaño y proliferación celular de plantas mutantes para <i>YAF9A</i> y <i>YAF9B</i>	156
3.4. Análisis transcriptómico global del doble mutante <i>yaf9a yaf9b</i>	156
3.5. Análisis de la posible interacción física entre componentes de SWR1-C de Arabidopsis	162
3.5.1. Análisis de la interacción física de AtSWC4 y AtYAF9A	162
3.5.2. Interacción física de la proteína AtSWC6 con AtSWC4 y AtYAF9A de Arabidopsis	175
3.6. Ensayos de unión de AtYAF9A y AtYAF9B a extractos de histonas de Arabidopsis	177
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>181</b>
1. La proteína SWC6 en Arabidopsis participa en la represión de la transición floral a través de su participación en el complejo SWR1	183

2. La proteína SWC4 de Arabidopsis juega un papel esencial en la viabilidad de las plantas, formando parte de los complejos SWR1 y NuA4	187
3. Los mutantes <i>yaf9a yaf9b</i> presentan alteraciones fenotípicas severas, incluyendo un fenotipo de floración temprana	192
4. Participación de las subunidades SWC6, SWC4 y YAF9 en los complejos SWR1 y NuA4 y su posible implicación en la regulación de la transición floral y otros procesos del desarrollo	197
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>210</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>211</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>243</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>261</b>

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABRC: Arabidopsis Biological Resource Center of Ohio State University

ATP: Adenosina trifosfato

$\alpha$ -32P-dCTP:  $\alpha$ -32P-Deoxitidina trifosfato

CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

cDNA: Complementary Deoxyribonucleic Acid

DMSO: Dimetilsulfóxido DTT: 2,4- ditioreitol

DNA: Deoxyribonucleic Acid

D.O.: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilen-diamin-tetraacético

GFP: Green fluorescent protein

GM: Growth medium

GST: Glutathione S-transferase

GUS:  $\beta$ -D-glucuronidase

IPTG: Isopropil-tiogalactopiranosido

Kb: Kilobase

kDa: Kilodalton

LB: Lysogeny broth

M: Mitosis

MES: 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

mRNA: RNA mensajero

MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

MS: Murashige y Skoog

$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ :  $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$

NASC: Nottingham Arabidopsis Centre

NCBI: Nacional Center of Biotechnology Information

p/v: Peso/volumen

pb: Pares de bases

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PIPES: Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic) acid

PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride

qPCR: PCR cuantitativa

r.p.m.: revoluciones por minuto

RNA: Ribonucleic acid

RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR

SDS: Dodecil sulfato sódico

SEM: Scanning Electron Microscope

TBE: Tris/Borato/EDTA

T-DNA: Transferred DNA

TE: Tris-EDTA pH 8.0

Tris: Trihidrometil aminometano

UTR: Unstranlated Region

WT: Fenotipo silvestre

X-Gluc: 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -glucurónico

YFP: Yellow fluorescent protein

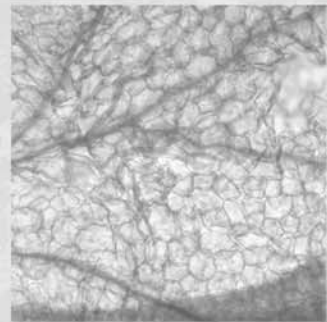
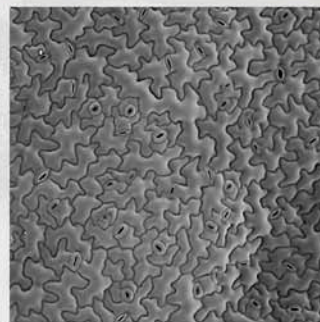
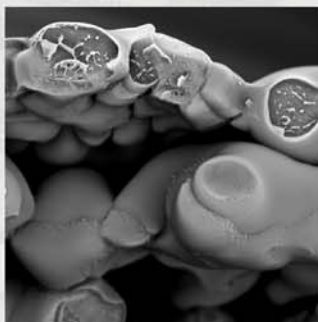
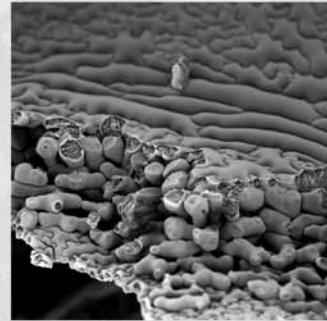
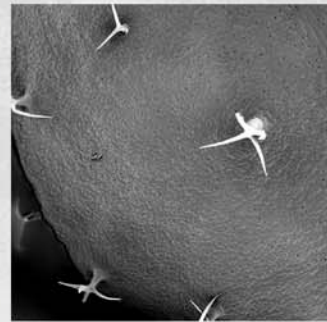
ZT: Zeitgeber time

## SUMMARY

The substitution of histone H2A by the histone variant H2A.Z is catalyzed by the chromatin remodelling complex SWR1, which has been proposed to play a key role in achieving high levels of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* expression during the vegetative phase of Arabidopsis. We are characterizing the Arabidopsis homologues of the SWC6, SWC4 and YAF9 components of the yeast SWR1 complex. The subunits SWC4 and YAF9 are shared with the histone acetyltransferase complex NuA4. Both SWR1-C and NuA4-C have an intimate relationship in yeast, regulating multiple biological processes such as gene expression, heterochromatin boundary maintenance, and DNA repair. We have identified putative orthologues for the *YAF9* gene, *YAF9A* and *YAF9B*, the only two YEATS domain-containing proteins present in the Arabidopsis genome, as well as orthologues for the *SWC6* and *SWC4* genes. In this work, we have determined that *swc6* and double mutant *yaf9a yaf9b* show early flowering and display pleiotropic defects in both vegetative and reproductive development. Indeed, SWC6 is implicated in flowering inhibition through both *FLC* and *FLC*-like genes dependent pathways. On the other hand, microarray data involving the *yaf9a yaf9b* double mutant corroborates the participation of these genes in the control of several developmental processes. Besides, a knockout allele for *AtSWC4* results to be lethal, indicating the essentiality of this protein as its yeast orthologue. For this reason, we have generated RNAi lines to knockdown the expression of the *AtSWC4* gene and we have demonstrated that they display pleiotropic phenotypic alterations in vegetative and reproductive traits. Additionally, we have demonstrated that SWC6, SWC4 and YAF9A establish physical interactions each other, *in vitro*. Otherwise, given that the FRIGIDA complex, involved in the up-regulation of *FLC*, recruits AtTAF14 homolog, plus some other components of the SWR1 complex such as SWC6 and YAF9, these results provide an insight into how different chromatin remodelling mechanisms control the floral transition through the transcriptional regulation of *FLC*.



# INTRODUCCIÓN





## 1. LA TRANSICIÓN FLORAL

El desarrollo de las plantas viene determinado por la división de grupos de células pluripotentes denominados meristemos y por su posterior diferenciación en los distintos órganos vegetales (Shen y Xu, 2009). El meristemo apical es el responsable de la formación de la parte aérea de la planta, mientras que el meristemo radicular da lugar a las raíces. Las plantas son capaces de percibir múltiples señales ambientales y de adaptar su desarrollo a los cambios que se producen en el medio que las rodea (Srikanth y Schmid, 2011).

Uno de los procesos de desarrollo más importantes en las plantas es la transición floral, que consiste en el paso de la fase de desarrollo vegetativo a la fase reproductiva. *Arabidopsis* presenta una fase de desarrollo vegetativo en roseta caracterizada por la formación reiterada de hojas y meristemos axilares, sin elongación de los entrenudos. La transición entre la fase juvenil y la fase adulta del desarrollo vegetativo determina la adquisición de competencia del meristemo apical para responder al estímulo floral (Poethig, 1990), y se ha asociado con cambios en la morfología foliar y en el patrón de distribución de los tricomas en las hojas (Telfer et al., 1997). Cuando se induce la transición floral, se produce la elongación de los entrenudos, el desarrollo de las hojas caulinares del tallo principal y la producción de flores a partir de los meristemos reproductivos, dando lugar a la formación de una inflorescencia (Coen y Meyerowitz, 1991; Kim et al., 2009).

La transición floral es uno de los procesos de desarrollo más finamente regulados, ya que está modulado en respuesta tanto a factores ambientales como endógenos y de este proceso depende el éxito reproductivo de la planta (Amasino, 2010). Los factores endógenos dependen fundamentalmente del estado de desarrollo de la planta, mientras que los factores ambientales son principalmente el fotoperiodo (relación entre los periodos diarios de luz y oscuridad), la intensidad y la calidad de la luz y la temperatura. En concreto, el proceso mediante el cual la exposición prolongada a bajas temperaturas hace a las plantas competentes para florecer, se conoce como vernalización (Schmitz y Amasino, 2007; Kim et al., 2009).

Según la respuesta al fotoperiodo, las plantas se pueden dividir en tres grandes grupos (Jarillo et al., 2008; Andrés y Coupland, 2012):

i. Plantas de día largo (DL), en las que se induce la floración cuando el periodo de luz es más prolongado que el de oscuridad y suele coincidir con la estación de verano. Un ejemplo es la avena (*Avena sativa*).

ii. Plantas de día corto (DC), como el maíz (*Zea mays*) o el arroz (*Oryza sativa*), en las que la floración se induce por exposición a días donde el periodo de oscuridad es más prolongado que el de luz, normalmente en otoño.

iii. Plantas insensibles a fotoperiodo, como el tomate (*Solanum lycopersicum*).

De igual modo, hay especies que presentan un requerimiento absoluto de vernalización para florecer, como la remolacha (*Beta vulgaris*), mientras que otras responden a vernalización sin un requerimiento obligado o no responden en absoluto, como diversas especies de cereales (Kim et al., 2009).

Además de las condiciones ambientales, distintos tratamientos hormonales y químicos también ejercen un efecto sobre la transición floral, por lo que se ha propuesto que el estímulo floral consiste en un complejo grupo de compuestos, determinado por la interacción de las señales ambientales y endógenas (Bernier et al., 1993).

## **2. EL CONTROL GENÉTICO DE LA FLORACIÓN EN *ARABIDOPSIS THALIANA***

*Arabidopsis thaliana* es uno de los sistemas más importante empleado como modelo en el estudio de la transición floral. *Arabidopsis* es una especie anual, facultativa de DL, ya que no muestra ningún requerimiento obligado de fotoperiodo para florecer, si bien este proceso se ve acelerado en condiciones de DL. Además, algunos ecotipos son capaces de responder a tratamientos de vernalización (He, 2012).

### **2.1. Variación genética natural**

*Arabidopsis* presenta una elevada variación genética para el tiempo de floración en las poblaciones naturales, probablemente como consecuencia de procesos de adaptación a distintas condiciones ambientales. Se ha descrito que alelos funcionales y dominantes de los loci *FRIGIDA* (*FRI*) y *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) son los responsables del requerimiento de vernalización (Crevillén y Dean, 2011). *FRI* codifica una proteína coiled-coil específica de plantas, necesaria para la activación

transcripcional de *FLC* (Michael y Amasino, 2001; Song et al., 2012). Por su parte, *FLC* codifica un factor de transcripción de la familia MADS que actúa como represor de la floración (Sheldon et al., 2000; Michael y Amasino, 2001). Los tratamientos de vernalización reducen la expresión de *FLC* y hacen a este gen insensible a la activación por *FRI* (He y Amasino, 2005). Una vez que la planta ha sido vernalizada, la represión de *FLC* se mantiene estable durante el resto de su ciclo de vida y sólo se restablecen elevados niveles de expresión de dicho gen en la siguiente generación (He y Amasino, 2005; Song et al., 2012). En *Arabidopsis*, además, se han determinado cinco genes parálogos de *FLC*, denominados *MADS AFFECTING FLOWERING 1/FLOWERING LOCUS M (MAF1/FLM)*, *MAF2*, *MAF3*, *MAF4* y *MAF5* (Ratcliffe et al., 2001, 2003). Se ha demostrado que al menos dos de ellos, *MAF1/FLM* y *MAF2*, actúan como represores florales (Ratcliffe et al., 2001, 2003), lo que podría explicar por qué plantas con mutaciones nulas para *FLC* no eliminan totalmente la respuesta a la vernalización.

Las diferencias en los requerimientos de vernalización existentes en *Arabidopsis* dan lugar a distintas respuestas estacionales de floración, originando las variedades anuales de verano que presentan alelos de *FRI* no funcionales y carecen de requerimientos de vernalización para florecer (Johanson et al., 2000; Gazzani et al., 2003; Shindo et al., 2005). Estas variedades germinan en primavera y completan la formación de flores y frutos antes del final del verano. Las variedades de invierno presentan alelos dominantes de *FRI* y *FLC*, que responden a vernalización, de manera que germinan en otoño y solo florecen en la siguiente primavera, después de la exposición al frío, durante el invierno (Amasino y Michaels, 2010; Song et al., 2012).

Entre los ecotipos de ciclo rápido empleados en el laboratorio, Columbia (Col) posee un alelo de *FRI* no funcional y un alelo activo de *FLC* (Gazzani et al., 2003; Shindo et al., 2005), mientras que en el ecotipo Landsberg *erecta (Ler)*, ni el alelo de *FLC* ni el de *FRI* son funcionales (Gazzani et al., 2003; Michaels et al., 2003).

El estudio de variedades genéticas naturales ha permitido identificar otros genes implicados en la regulación del tiempo de floración en respuesta a factores como el fotoperiodo y la temperatura. Ejemplos de estos genes son *EARLY DAY INSENSITIVE/CRYPTOCHROME 2 (EDI/CRY2)*, *PHYTOCHROME D (PHYD)*, *PHYC*, *MAF1/FLM* y *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* (Aukerman et al., 1997; El-Din El-Assal et al., 2001; Balasubramanian et al., 2006a, 2006b; Wang et al., 2011; Albani et al., 2012; Undurraga et al., 2012).



## 2.2. Variación genética inducida

### 2.2.1. Rutas inductoras de la floración

El análisis de la variación natural y la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* afectados en el tiempo de floración que se han realizado en los últimos años ha permitido establecer una serie de rutas de inducción de la floración y revelar la existencia de diferentes reguladores genéticos de la transición floral (Baurle y Dean, 2006; Turck et al., 2008; Amasino y Michaels, 2010; He, 2012). Se ha propuesto la existencia de determinadas rutas que responden a factores ambientales, entre ellas la del fotoperiodo y la vernalización, que regulan la transición floral en respuesta a la duración del día y a la exposición prolongada a bajas temperaturas, respectivamente, y la ruta de floración dependiente de la temperatura ambiente, que responde a la temperatura de crecimiento. Otras rutas que no responden a factores ambientales sino a factores endógenos son la ruta autónoma, la ruta dependiente de la edad y la ruta de las giberelinas (GAs) (Jackson, 2009; Kim et al., 2009; Michaels, 2009; Jung et al., 2011; Andrés y Coupland, 2012; Porri et al., 2012). Estas rutas convergen en la regulación de la expresión de los integradores florales, que son los genes que controlan en último término la transición floral (Fornara et al., 2010). Los principales integradores florales son *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20)*, *AGL24* y *LEAFY (LFY)* (Turck et al., 2008; Lee y Lee, 2010; Srikanth y Schmid, 2011). Estos integradores regulan la expresión de los genes específicos que participan en la identidad del meristemo floral, *APETALA 1 (AP1)*, *AP2*, *CAULIFLOWER (CAL)*, *FRUITFULL (FUL)/AGL8* y *LFY*, los cuales determinan la identidad del meristemo reproductivo y regulan la expresión de genes de identidad de órgano floral, como *AP1*, *AP2*, *AP3*, *PISTILLATA (PI)*, *AGAMOUS (AG)* y *SEPALLATA 1-4 (SEP1-4)* (Wigge et al., 2005; Jaeger et al., 2006; Turck et al., 2008; Causier et al., 2010) (Fig.1).

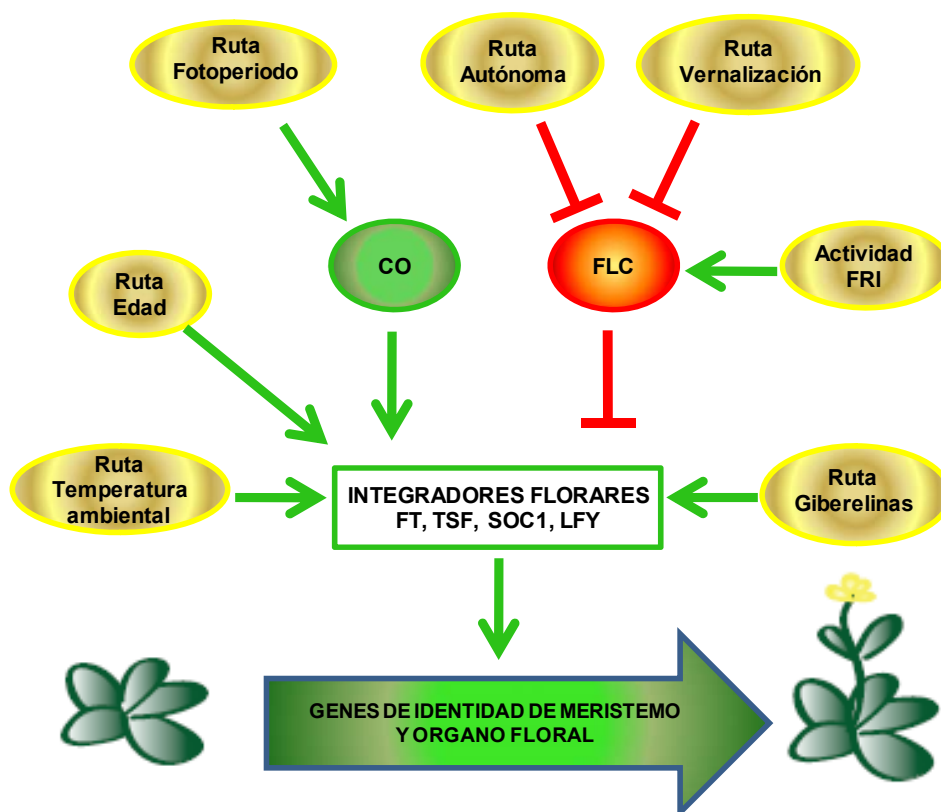


Fig. 1. Esquema de las rutas reguladoras de la floración propuestas en Arabidopsis.

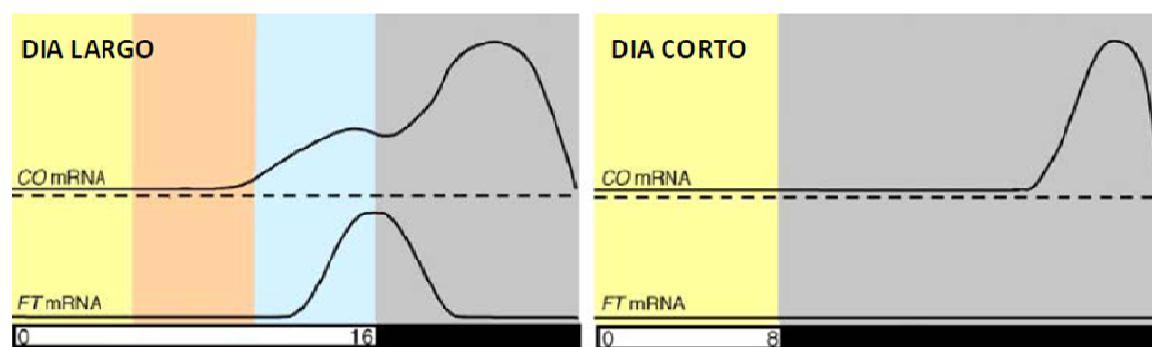
#### ▪ RUTA DEL FOTOPERIODO

Esta ruta se estableció a partir de la identificación de una serie de mutantes que muestran un fenotipo de floración tardía en condiciones de DL, pero no en DC (Searle y Coupland, 2004). Este retraso de la floración no puede rescatarse por vernalización. La ruta del fotoperiodo engloba a loci como *CONSTANS* (CO), *CRY2*, *GIGANTEA* (GI), *FD* y *FT* (Searle y Coupland, 2004).

Con el fin de regular el tiempo de floración en respuesta al fotoperiodo, las plantas necesitan medir los cambios que se producen en la duración del día (Imaizumi, 2010). Para ello, las plantas integran la información lumínica a través de los fotorreceptores y del oscilador circadiano, que a su vez, modulan varias respuestas de salida, como la floración (Imaizumi, 2010). Este mecanismo oscilador consiste en una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa entre proteínas que se expresan por la mañana y otras que se expresan al atardecer, y es el encargado de regular el patrón de expresión de multitud de genes con un periodo de oscilación próximo a las 24 horas (De Montaigu et al., 2010; Imaizumi, 2010; Jarillo y Piñeiro, 2011). En Arabidopsis, la capacidad para distinguir la longitud de los periodos de luz y de oscuridad se basa en la

regulación de la expresión de *CO*, dependiente del reloj circadiano y de la luz (Jarillo y Piñeiro, 2011; Andrés y Coupland, 2012). De esta manera, en condiciones de DL los niveles máximos de expresión de *CO* solapan significativamente con el periodo de iluminación, mientras que en DC la expresión de *CO* se limita al periodo de oscuridad (Suárez-López et al., 2001; Andrés y Coupland, 2012) (Fig.2).

*CO* es responsable de la activación transcripcional de los integradores florales *FT* y de su homólogo *TSF*, en los tejidos vasculares de las hojas (Tiwari et al., 2010; Jarillo y Piñeiro, 2011). Posteriormente, la proteína *FT* se moviliza por el floema hacia el meristemo apical, donde interacciona con el factor de transcripción tipo bZIP, *FD*, para activar la expresión de *SOC1* y *AP1* que actúan como activadores de la floración (Putterill et al., 2004; Baurle y Dean, 2006; Jarillo y Piñeiro, 2011). El gen *FT* presenta su máximo nivel de expresión en DL, durante la fase de coincidencia de la luz con el pico de expresión de *CO*, condiciones en las que *FT* promueve el inicio de la floración (Fig.2). Sin embargo, la proteína *CO* se degrada en la oscuridad, por lo que el nivel de expresión de *FT* en DC se mantiene bajo, de modo que la floración se retrasa (Fig.2).



**Fig. 2. Representación de los niveles de expresión de los mensajeros de *CO* y de *FT* en condiciones de DL y DC en *Arabidopsis* (adaptada de De Montaigu et al., 2010).**

La abundancia del mensajero de *CO* está controlada por múltiples reguladores como *GI*, *FLAVIN BINDING*, *KELCH REPEAT AND F-BOX1 (FKF1)*, *CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1)* y los genes *FLOWERING BHLH (FBHs)* (Andrés y Coupland; 2012; Ito et al., 2012a; 2012b).

En respuesta a la luz, la E3 ubiquitín-ligasa *FKF1* interacciona con la proteína *GI* en condiciones de DL, permitiendo la activación de la transcripción del RNA mensajero de *CO*, debido a la degradación de los represores *CDF1* y *CDF2* mediada por *FKF1* (Imaizumi et al., 2005; Sawa et al., 2007; Fornara et al., 2009; Andrés y Coupland, 2012;

Song et al., 2012). Bajo condiciones de DC, la interacción de GI y FKF1 no es estable, por lo que se acumulan las proteínas CDFs, impidiendo la expresión de CO (Sawa et al., 2007). Por tanto, al final del día en condiciones de DL pero no en DC, GI y FKF1 interaccionan, activando la degradación de las proteínas CDFs y permitiendo el aumento de los niveles de mRNA de CO (Andrés y Coupland, 2012).

Recientemente se ha demostrado que las proteínas FBH1, FBH2, FBH3 y FBH4 funcionan como activadores transcripcionales de CO mediante el reconocimiento de elementos tipo E-box en su promotor (Ito et al., 2012b). La sobreexpresión de los genes *FBHs* origina un aumento considerable de los niveles de expresión de CO, lo que provoca una aceleración de la floración independientemente de las condiciones fotoperiódicas (Ito et al., 2012b). Así, se puede concluir que el patrón de expresión diurno de CO es generado por la acción coordinada de reguladores transcripcionales positivos y negativos.

Además del control de la expresión de CO a nivel transcripcional, los niveles de la proteína CO también están regulados en función de la estabilidad, mediante su degradación por el proteosoma. Se ha demostrado que el complejo formado por la E3 ubiquitín-ligasa CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1) y las proteínas SUPPRESSOR OF PHYTOCROME A-105 (SPA1), degrada a CO en la oscuridad (Chen et al., 2010; Piñeiro y Jarillo, 2013). Por otro lado, se ha observado que durante la mañana, la proteína HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1), una E3 ubiquitín-ligasa, participa en la degradación de CO de forma independiente de COP1, asegurando la activación de *FT* en DL cuando las condiciones de luz son adecuadas y evitando que se adelante el momento de la floración en *Arabidopsis* (Lázaro et al., 2012).

Asimismo, la interacción de la proteína ELF3 con COP1 permite modular las rutas de señalización de la luz hacia el reloj circadiano y promover la degradación de GI (Yu, et al., 2008), de manera que se retrasa la floración (Yu et al., 2008b; Nusinow, et al., 2011). Por su parte GI, además de participar en la regulación del reloj circadiano, está implicado en la regulación de la expresión de CO, promoviendo la activación de *FT* bajo condiciones de DL (Amasino, 2010).

En *Arabidopsis*, distintas calidades de luz tienen un efecto diferente sobre la proteólisis de CO. Tanto la luz azul como la roja lejana promueven la floración, mientras que la luz roja, la retrasa (Valverde et al., 2004). Así, se ha comprobado que la luz roja

induce la degradación de CO en un proceso mediado por el fotorreceptor PHYTOCHROME B (PHYB) durante el amanecer, de manera que los niveles de CO no alcanzan el umbral necesario para iniciar la floración (Valverde et al., 2004; Jang et al., 2008). Recientemente se ha descrito que las proteínas PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR (PIFs) son responsables de regular negativamente los niveles de PHYB, promoviendo su ubiquitinación mediante COP1, de manera que los mutantes *cop1* y *pif* presentan elevados niveles de PHYB (Piñeiro y Jarillo, 2013).

Por su parte, la luz roja lejana inhibe la degradación de CO a través de PHYA, manteniendo altos los niveles de CO e induciendo la floración (Valverde et al., 2004; Jang et al., 2008). Finalmente, la luz azul controla el inicio de la floración a través de, al menos, tres mecanismos diferentes de regulación. Primero, promoviendo la interacción de FKF1 y GI necesaria para la degradación de las proteínas CDFs (Sawa et al., 2007; Lázaro et al., 2012). Segundo, a través del receptor de la luz azul, CRY2, que previene la degradación de CO mediante la interacción con el complejo formado por COP1-SPA1 (Zuo et al., 2012). Y por último, CRY2 se une al factor de transcripción CRYPTOCHROME-INTERACTING BASIC-HELIX-LOOP-HELIX 1 (CIB1) y modula la transcripción de *FT* directamente (Liu et al., 2008a, 2008b).

Entonces, en condiciones de oscuridad, la proteína CO no se acumula, ya que es rápidamente degradada. En condiciones de DL, cuando la transcripción de CO coincide con el periodo de luz, la proteína se acumula a niveles capaces de activar la expresión del mensajero de *FT* y promover el inicio de la floración. En cambio, en DC no existe coincidencia entre la luz y el pico de expresión de CO y, por tanto, el nivel de expresión de *FT* no aumenta, retrasándose el inicio de la floración (Valverde et al., 2004).

Se puede concluir que es la interacción de la luz con el mecanismo oscilador endógeno del reloj circadiano lo que regula la expresión de CO, modulando su actividad y permitiendo a la planta percibir la duración del día e iniciar o no el proceso de floración (Jang et al., 2008).



---

- **RUTA DE VERNALIZACIÓN**

En *Arabidopsis*, esta ruta regula el tiempo de floración a través de la represión del gen *FLC* principalmente y presenta cinco características básicas (Song et al., 2012):

i. Las plantas tienen la capacidad de discernir entre una prolongada exposición al frío y las pequeñas fluctuaciones de temperaturas que se originan en otoño (Amasino y Michaels, 2010).

ii. La regulación de la floración dependiente de vernalización tiene carácter cuantitativo, es decir, los niveles de expresión de *FLC* disminuyen de forma gradual a medida que aumenta el tiempo de exposición a bajas temperaturas (Sheldon et al., 2000).

iii. Se produce una clara separación temporal entre el establecimiento de la represión transcripcional de *FLC*, durante la exposición al frío, y el mantenimiento del silenciamiento de *FLC* después de la vernalización, cuando la planta vuelve a temperaturas normales de crecimiento (Turck y Coupland, 2011).

iv. La respuesta a vernalización está mediada por procesos a nivel epigenéticos que confieren un estado mitóticamente estable en la cromatina de *FLC* (Amasino y Michaels, 2010; Srikanth y Schmid, 2011).

v. Una vez que la planta ha completado el proceso de vernalización, la represión transcripcional de *FLC* se mantiene estable durante el resto de su ciclo de vida y solo se restablece un elevado nivel de expresión de *FLC* en la siguiente generación (He y Amasino, 2005; Song et al., 2012).

Los mecanismos epigenéticos se definen como aquellos que permiten modular la expresión génica mediante alteraciones en la estructura de la cromatina y no afectan a la secuencia de DNA. Estos cambios en el estado cromosómico son heredados incluso después de que el estímulo que los provocó sea eliminado (Bonasio et al., 2010; Lauria y Rossi, 2011). La cromatina de las células eucariotas está formada por unas unidades estructurales básicas denominadas nucleosomas. Cada nucleosoma está compuesto por 147pb de DNA, enrollado alrededor de un octámero de histonas (dos dímeros H2A-H2B y un tetrámero H3-H4) (Luger et al., 1997). Las cadenas de nucleosomas se pueden empaquetar en fibras más compactas, que dan lugar a la heterocromatina y que

generalmente coincide con zonas transcripcionalmente inactivas. La cromatina poco condensada o eucromatina contiene la mayor parte de los genes que se expresan activamente, puesto que su conformación permite el acceso de la maquinaria de transcripción. El resultado de esta estructura dinámica de la cromatina permite modular procesos como la recombinación, la replicación y reparación del DNA y la segregación cromosómica. Y es esencial en la regulación transcripcional de componentes de las rutas que controlan la transición floral y de los propios integradores florales (Farrona et al., 2008; Crevillen y Dean, 2011; Berr et al., 2011; Choi et al., 2011).

Se ha propuesto que el proceso de vernalización se puede dividir en tres fases (Song et al., 2012):

i. En la primera fase, antes de la exposición de la planta a bajas temperaturas, los niveles de expresión de *FLC* son elevados y la transición floral se encuentra reprimida.

ii. Posteriormente, en una segunda etapa, se produce una represión en la expresión de *FLC* inducida por el tratamiento de vernalización.

iii. Finalmente, cuando la planta vuelve a temperaturas normales de crecimiento, se mantiene el estado silenciado de *FLC*.

Antes de la exposición prolongada de la planta al frío, los niveles elevados de expresión de *FLC* se establecen durante la reproducción y la fase de embriogénesis (Sheldon et al., 2008; Choi et al., 2009) y se mantienen elevados en la fase de desarrollo vegetativo, impidiendo un cambio prematuro a la fase de desarrollo reproductivo (Kim et al., 2009). De esta manera, cada nueva generación requiere de un tratamiento de vernalización para florecer, previniendo la floración prematura en otoño (Song et al., 2012).

La respuesta de *Arabidopsis* a tratamientos de vernalización está regulada por procesos a nivel epigenético que inducen cambios en la cromatina de *FLC*. Estos cambios incluyen un descenso en la trimetilación de H3K4 (H3K4me3) y en la acetilación de H3 y H4 (H3Ac y H4Ac), marcas de transcripción activa de la cromatina, así como un aumento en la trimetilación de H3K9 y H3K27 (H3K9me3 y H3K27me3), características del estado inactivo de la cromatina de *FLC* (Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004; Sung et al., 2006; Schmitz et al., 2008; Amasino y Michaels, 2010). Todas estas modificaciones de la cromatina participan en el establecimiento del estado

reprimido de *FLC* y contribuyen a que esta represión se pueda mantener estable a lo largo de la vida de la planta (Amasino, 2010).

Durante la exposición a bajas temperaturas se produce un aumento de los niveles de dos transcritos no codificantes de *FLC*, denominados *COLD INDUCED LONG ANTISENSE INTRAGENIC RNA (COOLAIR)* y *COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA (COLDAIR)* (Swiezewski et al., 2009; Heo y Sung, 2011; Ietswaart et al., 2012). En las primeras 2-3 semanas de exposición al frío, se produce un incremento de la expresión del RNA, *COOLAIR*, seguido de un aumento de la expresión de *COLDAIR*, que alcanza su máximo en la tercera semana, provocando el silenciamiento de la expresión de *FLC* (Swiezewski et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que *COLDAIR* recluta hacia la región genómica de *FLC* a la proteína CURLY LEAF (CLF), un componente del complejo PRC2 (Polycomb-group Repressive Complex 2) responsable de la trimetilación de H3K27 (Heo y Sung, 2011). Durante las primeras cuatro semanas del proceso de vernalización, la trimetilación de H3K27 aumenta alrededor del sitio de iniciación de la transcripción y en el primer exón de *FLC* (Song et al., 2012). Aproximadamente 40 días después del inicio de la vernalización, tanto la expresión de *COLDAIR* como la del mRNA de *FLC* decaen, mientras que se induce la transcripción del gen *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)* (Song et al., 2012). *VIN3* codifica una proteína con un dominio PHD (Plant Homeo-Domain) que solo se expresa en condiciones de bajas temperaturas y aumenta su expresión progresivamente en función de la duración de esta exposición (Sung y Amasino, 2004; Alexandre y Hennig, 2008). La proteína *VIN3* interacciona con el complejo PRC2 (PRC2-C), creando un complejo *VIN3-PRC2*, al que se une a otras proteínas PHD (De Lucia et al., 2008). Este complejo PHD-PRC2 trimetila los residuos H3K27 presentes en la región del primer exón y del primer intrón de *FLC*, para silenciar específicamente su expresión génica durante la vernalización (Sung y Amasino, 2004; Heo y Sung, 2011; Andrés y Coupland, 2012; He, 2012). Tras completarse el proceso de vernalización, cuando la planta vuelve a condiciones de temperatura más cálidas, la marca H3K27me3 pasa a localizarse a lo largo de toda la secuencia codificante de *FLC* (Crevillén et al., 2012; He, 2012).

Durante la respuesta de vernalización, la represión epigenética de *FLC* implica la actividad coordinada de los genes *VIN3*, *VERNALIZATION 1 (VRN1)*, *VRN2*, *VRN5/VIN3-LIKE 1 (VIL1)* y *PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5/ SHK1 KINASE BINDING PROTEIN1 (AtPRMT5/SKB1)* (Gendall et al., 2001; Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004; Sung et al., 2006; Greb et al., 2007; Schmitz et al., 2008). *VRN1* codifica una proteína que presenta un dominio de unión a DNA (Levy et al., 2002;

King et al., 2012). *VRN2* codifica una proteína homóloga a Suppressor of zeste (Su (z) 12), componente del complejo PRC2 de *Drosophila* (Gendall et al., 2001). Por su parte, *VRN5/VIL1* codifica una proteína con un dominio PHD, capaz de interactuar con VIN3 y formar el complejo PHD-PRC2 junto con VRN2, VIL2/VEL1, CLF, FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 (MSI1) (De Lucia et al., 2008; He, 2012). Como ya se ha mencionado, este complejo deposita la marca H3K27me3 en la cromatina de *FLC* para su silenciamiento durante la vernalización (Sung et al., 2006a; Greb et al., 2007; He, 2012). Además, la proteína metiltransferasa de arginina tipo II, AtPRMT5/SKB1, también es necesaria para reprimir la expresión de *FLC* en respuesta a vernalización. Esta proteína se une al promotor de *FLC* y cataliza la dimetilación simétrica del residuo R3 de la histona H4 (H4R3me2), una marca característica de represión transcripcional (Wang et al., 2007; Schmitz et al., 2008).

Por tanto, la metilación de H3K27 en la cromatina de *FLC* depende de complejas interacciones entre proteínas como VRN2, VIN3 y VRN5/VIL1 que suponen modificaciones epigenéticas de represión transcripcional y permiten el mantenimiento estable del estado silenciado de *FLC* después de la vernalización, cuando la planta se desarrolla a la temperatura normal de crecimiento (Sheldon et al., 2006; Kim y Sung, 2011). Se ha sugerido que tanto la señal H3K27me3 como la represión de la expresión de *FLC* no pueden mantenerse eficientemente en tejidos que no se dividen activamente después de transferirse a temperaturas más cálidas. En ausencia de replicación de DNA, la señal H3K27me3 es añadida a la cromatina al comienzo del gen *FLC* durante periodos de frío, pero se elimina del locus cuando se vuelve a temperaturas más cálidas. Esto sugiere que la replicación de DNA es esencial para mantener la represión de *FLC* por vernalización (Finnegan y Dennis, 2007).

Por otro lado, se ha descrito que la proteína *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1/TERMINAL FLOWER 2 (LHP1/TFL2)*, homóloga de *HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (HP1)* de animales y levaduras, podría formar parte del complejo PRC1-like (Polycomb-group Repressive Complex 1) de *Arabidopsis* (Zheng y Chen, 2011). Así, la proteína LHP1/TFL2 reconoce la marca H3K27me3 y participa junto con el complejo PRC2, en el mantenimiento mitóticamente estable del estado silenciado de *FLC*, característico de la vernalización (Mylne et al., 2006; Kim y Sung, 2011). La proteína específica de plantas EMBRYONIC FLOWER 1 (EMF1) también ha sido propuesta como parte del complejo PRC1-like de *Arabidopsis*. Esta proteína es necesaria para el

mantenimiento del estado reprimido de diferentes genes homeóticos, como *AG*, durante el desarrollo vegetativo (Calonje et al., 2008; Kim et al., 2010).

La metilación de H3K9 también parece estar involucrada en el mantenimiento de la represión de *FLC* una vez que la planta ha vuelto a la temperatura normal de crecimiento (Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004; Sung et al., 2006b; Greb et al., 2007). En los mutantes *vrn1*, la metilación de la H3K27 aumenta durante el tratamiento de frío, en cambio, la metilación de la H3K9 no se incrementa y no se mantiene el estado reprimido de *FLC* cuando las plantas se desarrollan a la temperatura normal de crecimiento (Levy et al., 2002; Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004). De forma análoga, en el mutante *lhp1* tampoco se pueden mantener los niveles de metilación de la H3K9, que sólo aumentan cuando las plantas se someten a bajas temperaturas (Sung et al., 2006b). Se ha propuesto que tanto LHP1/TFL2 como VRN1 estarían implicados en la represión de *FLC* al mantener elevados los niveles de metilación de la H3K9, característicos del estado vernalizado de la planta (Bastow et al., 2004; He y Amasino, 2005; Sung et al., 2006b) (Fig. 4). En animales, el mantenimiento de la represión mediada por PRC2-C requiere del PRC1-C, que se une a la marca H3K27me3 y la mantiene. En plantas no se ha descrito un PRC1-C similar al de animales, pero se ha propuesto un complejo PRC1-like de Arabidopsis formado por las proteínas LHP1/TFL2, EMF1, AtBMI1A (B LYMPHOMA MO-MLV INSERTION REGION 1) y AtBMI1B (Sánchez-Pulido et al., 2008; Bratzel et al., 2010), aunque está por determinar si las proteínas AtBMI1A y AtBMI1B participan en el silenciamiento de *FLC* mediado por vernalización (Kim y Sung, 2011). Este complejo PRC1-like de Arabidopsis podría participar en los mecanismos de represión floral mediados por PcG (Polycomb group) (Calonje et al., 2008; Bratzel et al., 2010; Kim et al., 2010). Todavía se desconoce la naturaleza molecular de las enzimas que llevan a cabo la metilación de la H3K9 sobre la cromatina de *FLC*, así como el sensor que inicia la respuesta a la vernalización en Arabidopsis.

Cuando la exposición al frío cesa, la expresión de *VIN3* también lo hace, pero los niveles de H3K27me3 en *FLC* siguen aumentando por la acción del complejo PHD-PRC2 y se extienden por todo el locus *FLC* (He, 2012). La marca H3K27me3 es reconocida por la proteína LHP1/TFL2, componente del complejo PRC1-like de Arabidopsis que participa en el mantenimiento del estado silenciado de *FLC*, asegurando la floración solo cuando la planta se encuentra en las condiciones ambientales adecuadas (Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007b, 2007c; He, 2009).

Además, recientemente se han descrito otros mecanismos de regulación de la expresión de *FLC*, inducidos por vernalización. Este es el caso de la regulación de la expresión génica mediante la formación de bucles a nivel cromosómico que, a menudo, aproximan las secuencias reguladoras con sus genes diana (Li et al., 2007; Crevillén et al., 2012). La formación de estos bucles genéticos se origina en una ronda inicial de transcripción y requiere de la interacción del factor transcripcional de la RNA polimerasa II, TFIIB, con factores de procesamiento del extremo 3' del gen (Singh y Hampsey, 2007; Perkins et al., 2008; Medler et al., 2011). En *Arabidopsis* se ha detectado la formación de un bucle en el locus *FLC*, generado por la interacción de las regiones 3' y 5' que flanquean a este gen (Crevillén et al., 2012). El análisis de este bucle sugiere que su formación no depende de los niveles de expresión de *FLC* (Crevillén et al., 2012). Sin embargo, en las 2 primeras semanas de exposición al frío, este bucle desaparece, provocando el silenciamiento de la expresión de *FLC* y no se reconstituye hasta que la planta no vuelve a temperaturas más cálidas de crecimiento (Crevillén et al., 2012). Esta interrupción del bucle de *FLC*, no depende de la proteína VIN3 y se origina de forma paralela a la formación del transcrito antisentido de *FLC* (Crevillén et al., 2012). Finalmente, se ha sugerido que la eliminación del bucle es un mecanismo previo al cambio del estado activado al estado transcripcionalmente reprimido de *FLC* (Crevillén et al., 2012).

Aunque el locus *FLC* es el mayor responsable de los requerimientos de vernalización en *Arabidopsis* (Kim et al., 2010), los mutantes nulos *flc-3* aún mantienen cierta respuesta a las bajas temperaturas, especialmente bajo condiciones de DC (Michaels y Amasino, 2001). Esto indica que otros genes deben contribuir al requerimiento de vernalización (Zografos y Sung, 2012). De hecho, de los 5 genes parálogos de *FLC* descritos en *Arabidopsis*, la vernalización reprime a *MAF1/FLM* y *MAF2-4*, pero induce la expresión de *MAF5* (Sheldon et al., 2009; Zografos y Sung, 2012). *FLC* y algunos de los genes *MAFs* comparten reguladores como VERNALIZATION INDEPENDENCE 5 (VIP5) y EARLY FLOWERING 8 (ELF8/VIP6), componentes del complejo PAF1 (RNA Polymerase II-Associated Factor 1) (Krogan et al., 2003a; He et al., 2004; Oh et al., 2004) y EARLY IN SHORT DAYS 1/ACTIN RELATED PROTEIN 6 (ESD1/ARP6) que forma parte del complejo SWR1 (SWR1-C) en *Arabidopsis* (Martín-Trillo et al., 2006). Como ocurre para *FLC*, en respuesta a vernalización, VIN3 interacciona físicamente con VRN5/VIL1 y participan en el enriquecimiento de H3K9me3 y H3K27me3 de la cromatina de *MAF1/FLM* (Sung et al., 2006; Zografos y Sung, 2012). Por su parte, una proteína relacionada con VIN3, VIL2/VEL1, se une preferentemente a H3K9me2 y es requerida para la represión de

*MAF5* a través del complejo PRC2 (Kim y Sung, 2010). Es importante destacar las similitudes existentes en los mecanismos de regulación génica entre los genes *FLC*, *MAF1/FLM* y *MAF3*, ya que en la cromatina de todos ellos se produce un aumento de la marca H3K27me3 como respuesta a vernalización y su represión depende de la presencia de VIN3 (Sheldon et al., 2009).

Por tanto, entre los genes implicados en esta compleja red genética que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis* en respuesta a bajas temperaturas, *FLC* aparece como un regulador negativo central en este proceso y probablemente es uno de los mejores ejemplos del estudio sobre regulación epigenética que se han llevado a cabo en *Arabidopsis* (Reyes, 2006).

- **RUTA DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL**

Las plantas son altamente sensibles a las variaciones de temperatura que se producen en el medio que las rodea y pueden percibir incluso cambios de un grado de diferencia (Kumar y Wigge, 2010). Las plantas de *Arabidopsis* florecen antes cuando se cultivan a una temperatura ambiental de 23°C que cuando se cultivan a 16°C, en condiciones de DC (Blázquez et al., 2003; Kumar et al., 2012). El gen *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) juega un importante papel en esta respuesta, ya que los mutantes *svp* son insensibles a estas variaciones en la temperatura de crecimiento (Lee et al., 2007). *SVP* codifica una proteína tipo MADS box que se une a los promotores de *FT* y *SOC1* reprimiendo su expresión y retrasando la floración a bajas temperaturas (16°C) (Lee et al., 2007). *SVP* forma parte de un complejo represor de la floración, en el que también se encuentra *FLC*, que desempeña un papel central en la regulación del inicio de la floración en respuesta a la temperatura ambiental (Li et al., 2008). Por lo tanto, además de la activación en respuesta a fotoperiodo, la expresión de *FT* es activada por el aumento de la temperatura ambiente (He, 2012).

Se ha demostrado que otros mutantes como *phyB* y *cry2* presentan alteraciones en el tiempo de floración dependientes de la temperatura (Srikanth y Schmid, 2011). En el caso de *phyB* su floración se ve acelerada cuando aumenta la temperatura de 16°C a 23°C (Srikanth y Schmid, 2011). De forma similar, en los mutantes *cry2* se observa un retraso de la floración cuando la temperatura de crecimiento desciende a 16°C (Srikanth y Schmid, 2011).

Por su parte, las variaciones naturales de *Arabidopsis* que carecen de los alelos funcionales *FLC* y *FRI*, responden a elevadas temperaturas y florecen de forma más temprana a 27°C. Sin embargo, variedades que contienen alelos *FRI* y *FLC* activos, responden de manera más débil a un aumento de la temperatura, lo que indica que *FLC* participa en la regulación de la floración, suprimiendo la respuesta a temperaturas elevadas (Balasubramanian y Weigel, 2006).

Se ha descrito que el gen *HOS1* que participa en la ruta del fotoperiodo mediante la degradación de CO, particularmente durante el periodo de iluminación (Lázaro et al., 2012), también participa en el control del tiempo de floración a través de la respuesta a la temperatura ambiente (Lee et al., 2012). Originalmente, *HOS1* se identificó como un regulador clave de la transcripción de genes que responden a bajas temperaturas (4°C) (Ishitani et al., 1998; Lee et al., 2001). Posteriormente se ha demostrado que *HOS1* interacciona con la proteína INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 (*ICE1*) para promover su degradación bajo condiciones de estrés por bajas temperaturas (Dong et al., 2006). Bajo condiciones de temperatura normal de crecimiento (16-23°C), los mutantes *hos1* presentan un fenotipo de floración temprana, insensible a los cambios de temperatura (Lee et al., 2012) y muestran un aumento de la expresión de *FT* y *TSF* y una reducción de la expresión de *FLC*, tanto a 23°C como a 16°C. Sin embargo, estos mutantes son capaces de responder a vernalización y a estímulos por giberelinas (Lee et al., 2012), por lo que se ha propuesto que *HOS1* juega un importante papel en la modulación de la floración en respuesta a bajas temperaturas (Lee et al., 2012).

Los genes *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* y *ELF3* también están implicados en la regulación termosensible de la floración en *Arabidopsis* (Strasser et al., 2009). Basado en la similitud de secuencia presente entre las proteínas *FT* y *TFL1*, se ha propuesto un modelo mediante el cual ambas proteínas compiten por regular la actividad de *FD* (Giakountis y Coupland, 2008). *TFL1* regula la respuesta de la planta a la temperatura ambiente, de forma independiente al fotoperiodo, mientras que *ELF3* probablemente participa en el control de la floración mediante la respuesta a cambios en la temperatura conectada con la ruta inducida por la duración del día. Por otro lado, se ha propuesto que *ELF3* actúa en las hojas, lo que coincide con la interacción de esta proteína en la ruta del fotoperiodo, mientras que *TFL1* podría regular la expresión de *SOC1* en el meristemo apical del tallo (Strasser et al., 2009). De forma similar, en respuesta a temperaturas elevadas, el factor de transcripción *PIF4* se une a *FT*, activando su transcripción de una forma independiente de *CO* y del fotoperiodo, y promoviendo la floración (Kumar et al., 2012).



Otro gen implicado en esta ruta es *MAF1/FLM*, que funciona como un represor floral, reprimiendo la expresión de *FT* bajo condiciones de DC (Balasubramanian et al., 2006a). Cuando la planta de *Arabidopsis* es expuesta a 27°C, el mRNA de *MAF1/FLM* sufre un splicing alternativo y origina una proteína más pequeña, que permite una acumulación de *FT* acelerando la floración (Balasubramanian et al., 2006a; Balasubramanian y Weigel, 2006).

Por último, el complejo SWR1 también participa en el control de la ruta dependiente de la temperatura ambiental (Kumar y Wigge, 2010). Este complejo media el intercambio de la histona H2A por la variante histónica H2A.Z en los nucleosomas que rodean diferentes loci, incluyendo *FT*, de forma dependiente de ATP. A temperaturas normales de crecimiento dicha marca está presente en la cromatina, alrededor del sitio de iniciación de la transcripción de *FT*, regulando negativamente su expresión. Cuando las temperaturas son elevadas, 27°C, se producen cambios en la dinámica de la cromatina y dicha marca es eliminada de *FT*, permitiendo la entrada de la maquinaria de transcripción necesaria para su expresión, dando lugar a la activación de la floración (Kumar y Wigge, 2010; He, 2012). Otras evidencias experimentales demuestran que la ruta de la floración en respuesta a la temperatura ambiente también está controlada por la formación de microRNAs (miRNAs) que regulan en último término la expresión de *FT* (Lee et al., 2010; Kim et al., 2012).

#### ▪ RUTA AUTÓNOMA

La ruta autónoma se caracteriza por inducir la floración de una forma independiente de las señales ambientales. Existen algunos genes que han sido relacionados clásicamente con esta ruta como son los loci *FCA*, *FY*, *FPA*, *LUMINIDEPENDENS (LD)*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, *FVE*, *FLOWERING LOCUS K HOMOLOGY DOMAIN (FLK)* y *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6/JUMONJI 12 (REF6/JMJ12)* (Michaels y Amasino, 1999, 2001; Lee et al., 2000; Sheldon et al., 2000). Las mutaciones en estos loci producen un retraso de la floración tanto en DL como en DC, debido al aumento de la expresión de *FLC*, fenotipo de floración que se puede rescatar por tratamientos de vernalización (Johanson et al., 2000; Michaels y Amasino, 2001). La función bioquímica de las proteínas que participan en la ruta autónoma se puede dividir en dos categorías, las proteínas que funcionan en mecanismos de unión y procesamiento de RNA, y aquellas que participan en procesos de remodelación de la cromatina de *FLC* (Amasino y Michaels, 2010). Los genes *LD*, *FCA*, *FLK*, *FPA* y *FY* codifican proteínas que contienen dominios de unión a RNA (Chan y Struhl, 1997;

Baurle y Dean, 2006), por lo que se les atribuye un posible papel en el metabolismo del RNA (Macknight et al., 1997; Schomburg et al., 2001; Simpson et al., 2003; Lim et al., 2004; Manzano et al., 2009). El gen *LD* codifica un factor de transcripción con un homeo-dominio que se une al RNA (Lee et al., 1994; Chan y Struhl, 1997; Amasino, 2010) Además, LD participa en la regulación del integrador floral *LFY* (Srikanth y Schmid, 2011) y se une a la proteína SUPPRESSOR OF FRI4 (SUF4), componente del FRI-C, previniendo su acción sobre *FLC* (Kim et al., 2006; Choi et al., 2011). Por su parte, el gen *FY* presenta homología con un factor esencial de poliadenilación y procesado de extremos 3' del mRNA, de levaduras (Simpson et al., 2003; Baurle y Dean, 2006). El RNA antisentido de *FLC*, *COOLAIR*, presenta dos sitios diferenciados donde puede darse una poliadenilación alternativa, una zona proximal alrededor del sexto intrón y una zona distal alrededor del promotor de *FLC* (Wu et al., 2011). Las proteínas FY y FCA se asocian con *FLC* en la zona proximal de poliadenilación, por lo que se ha sugerido la posibilidad de que FCA interaccione con *COOLAIR* y permita la entrada de la maquinaria de transcripción al extremo 3' del RNA mediante la interacción de FY, estimulando la poliadenilación del sitio proximal en *FLC* (Liu et al., 2007; Ietswaart et al., 2012). Además, FPA también participa en la poliadenilación del extremo 3' del mRNA de *FLC* en la zona proximal, aunque actúa de forma independiente de FY (Ietswaart et al., 2012). FPA favorece la activación de *FLD* que codifica una proteína homóloga a la LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE 1 (LSD1) humana y funciona reduciendo los niveles de dimetilación de H3K4 en *FLC* (Jiang et al., 2007). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado otros tres genes que codifican homólogos de LSD1: *LSD1-LIKE 1 (LDL1)*, *LDL2*, *LDL3* (Jiang et al., 2007). Las proteínas FLD, LDL1 y LDL2 participan en el control del tiempo de floración reprimiendo la expresión de *FLC* (He et al., 2003; Jiang et al., 2007). La reducción de los niveles de H3K4m2 en *FLC* da lugar a un estado de la cromatina reprimido y al descenso de la expresión de *COLDAIR* y *COOLAIR* (Liu et al., 2007, 2010a; Wu y Dean, 2012). Se puede considerar que las proteínas FPA y FCA son funcionalmente redundantes en el control de la floración y el silenciamiento génico, ya que ambas participan en la expresión de *COOLAIR* y en la formación de los extremos 3' de *FLC* mediante una poliadenilación alternativa (Hornyk et al., 2010).

Estas observaciones evidencian que una batería de distintas proteínas de unión a RNA, como FCA, FPA y FY, están implicadas en el procesamiento co-transcripcional de transcritos no codificantes de *FLC*, participan en el silenciamiento de *FLC* (Chan y Struhl, 1997; Baurle y Dean, 2006; Liu et al., 2010a) y por tanto, en la regulación post-transcripcional del tiempo de floración en *Arabidopsis* (Lim et al., 2004). La reducción en

los niveles de expresión de *FLC* dependiente de FCA, FPA y FY requiere de la cooperación de las proteínas FLD y FVE (Liu et al., 2007; Baurle y Dean, 2008; He, 2012). *FVE* codifica a una proteína de la familia MS11-like que participa en complejos de deacetilación de histonas (HDAC) sobre la cromatina de *FLC* (Ausín et al., 2004; Kim et al., 2004).

Recientes estudios han revelado que FLD se asocia a las proteínas HDA6 (HISTONE DEACETYLASE 6) y FVE, con función deacetilasa de histonas, para formar un complejo FLD-HDA6-FVE que interviene en la desmetilación de H3K4 y en la deacetilación de las colas de histonas en *FLC*, reprimiendo su expresión y permitiendo la transición floral (Gu et al., 2011; Yu et al., 2011; He, 2012). También se ha sugerido la existencia de una interacción funcional entre FLD y PRC2-C, de manera que se produce una desmetilación de H3K4, deacetilación de histonas y trimetilación de H3K27, permitiendo el establecimiento de un estado reprimido de la cromatina de *FLC* (He, 2012). Todas estas observaciones permiten establecer la acción coordinada del complejo FLD-HDA6-FVE con PRC2-C y con el transcrito no codificante de *FLC*, para determinar un estado de la cromatina transcripcionalmente reprimido de forma estable (Liu et al., 2007; 2010a; Gu et al., 2011; He, 2012).

Por otro lado, *REF6/JMJ12* codifica una proteína tipo Jumonji, una clase diferente de desmetilasa de histonas, específica de H3K27me<sub>2/3</sub> (He et al., 2003; Noh et al., 2004; Jiang et al., 2007; Agger et al., 2008; Lu et al., 2011). La sobreexpresión de *REF6/JMJ12* revela la activación de los integradores florales *FT* y *SOC1*, por lo que se ha propuesto a *REF6/JMJ12* como un regulador de la floración clave que participa en los cambios producidos en la activación de la expresión génica, a través de los niveles de metilación de H3K27 (Noh et al., 2004; Lu et al., 2011).

Recientemente se ha descrito una familia de metiltransferasas de arginina (PRMTs) que se pueden adscribir a esta ruta y que también participan en la represión de *FLC* (Schmitz et al., 2008; Amasino, 2010). Este es el caso de la proteína AtPRMT10 (PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 10) de *Arabidopsis*, una metiltransferasa de tipo I. Se ha comprobado que AtPRMT10 dimetila H4R3 asimétricamente, *in vitro* (Niu et al., 2007). Los mutantes *atprmt10* presentan un aumento de la expresión de *FLC* que inhibe la transición floral (Niu et al., 2007).

Concluyendo, la ruta autónoma que controla el tiempo de floración no parece ser una ruta lineal sino que comprende una colección de genes implicados en: (1) la

represión de la expresión génica y (2) el establecimiento de los niveles basales de expresión de *FLC* (Amasino, 2010).

▪ **RUTA DE GIBERELINAS**

En *Arabidopsis*, la aplicación exógena de giberelinas (GAs) acelera la floración, particularmente en condiciones de DC (Chandler y Dean, 1994). Las mutaciones en los loci que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de giberelinas, originan un descenso de la germinación, defectos en la formación de los órganos florales y retrasan la floración (Srikanth y Schmid, 2011). En *Arabidopsis* se han identificado tres proteínas funcionalmente redundantes, denominadas *GID1* (*GIBBERELLIC INSENSITIVE DWARF 1*) que son responsables de percibir la señal de GAs (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007). El triple mutante *gid1* presenta un fenotipo de floración tardía, incluso en DL (Srikanth y Schmid, 2011), lo que indica que el papel de las GAs no está limitado a DC, sino que también participa en la regulación de la floración bajo condiciones de DL (Srikanth y Schmid, 2011). Por su parte, los mutantes *ga1-3*, que suprimen totalmente la floración en DC, acumulan ciertos niveles de GAs, lo que podría explicar las diferencias observadas respecto al fenotipo de floración del triple mutante *gid1* (Wilson et al., 1992; Silverstone et al., 1998; King et al., 2001).

En ensayos genéticos dirigidos a la búsqueda de mutantes resistentes al paclobutrazol, un inhibidor de la biosíntesis de GAs, se identificó la proteína *SPINDLY* (*SPY*) como un regulador negativo de la señalización de las GAs (Srikanth y Schmid, 2011). Trabajos realizados recientemente en arroz indican que *SPY* regula la acción de las proteínas *DELLA* a través de la ruta de GAs, una familia de proteínas que funcionan como represores del crecimiento y del desarrollo de las plantas (Shimada et al., 2006; Harberd et al., 2009; Sun, 2010). La unión de los receptores *GID1* a las GAs induce un cambio conformacional en las proteínas *DELLA* que promueve su degradación mediante el proteosoma y la liberación de los factores transcripcionales *PIF4* y *PIF5*, que tenían impedida su unión al DNA (De Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Murase et al., 2008; Porri et al., 2012). Por tanto, las proteínas *DELLA* son importantes integradores de la señal de GAs y juegan un papel fundamental en la inmovilización de las proteínas tipo *PIFs*, con las que interactúan directamente (De Lucas et al., 2008; Schwechheimer y Willige, 2009). Así, la regulación de las proteínas *PIFs* depende de la luz, la temperatura ambiente y las GAs, por lo que estos factores representan un punto de convergencia en la regulación de la floración (Srikanth y Schmid, 2011).

Adicionalmente, los genes *GATA NITRATE INDUCIBLE CARBON-METABOLISM INVOLVED* (*GNC*) y *GNC-LIKE* (*GNL*) codifican a factores GATA que inhiben la floración (Richter et al., 2010). Estos dos genes *GNC* y *GNL*, son dianas directas de los factores PIFs, por lo que son regulados negativamente por GAs de manera dependiente de las proteínas DELLA (Richter et al., 2010).

Diferentes estudios defienden el papel de la ruta de las GAs en la regulación de la expresión de *FT* de forma paralela a la regulación de *CO*, bajo condiciones de DL, para promover la floración (Hisamatsu y King, 2008). Por otro lado, las GAs también intervienen en la regulación del integrador floral *SOC1*, bajo condiciones de DC (Moon et al., 2003).

A partir del estudio de los dobles mutantes *ga1-3 co*, se determinó que la deficiencia en la biosíntesis de GAs presenta un efecto aditivo en el retraso de la floración originado en los mutantes *co*, bajo condiciones de DL (Putterill et al., 1995). En DL, las GAs son necesarias para aumentar los niveles de expresión de *FT* y *TSF*, en la hoja, independientemente de *CO* y *GI*, y son transportados al meristemo durante la inducción floral (Hisamatsu y King, 2008; Srikanth y Schmid, 2011). Los defectos en la señalización de las GAs en el tejido vascular reducen los niveles de expresión de *FT* y *TSF* y retrasan la floración (Hisamatsu y King, 2008; Galvão, et al., 2012). Bajo condiciones de DL en el meristemo, las GAs no son necesarias para activar la expresión de *SOC1*, como ocurre en DC, pero sí son necesarias para promover la floración de forma independiente del fotoperiodo, a través de la transcripción de los genes *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) tanto en las hojas como en el meristemo del tallo (Galvão et al., 2012; Porri et al., 2012). Por tanto, las GAs presentan un importante papel en la promoción de la transcripción de los genes *FT*, *TSF* y *SPLs* durante la inducción de la floración en respuesta a DL y estas funciones están espacialmente separadas entre hojas y meristemos (Galvão et al., 2012; Porri et al., 2012).

Por otro lado se ha establecido un papel esencial para los genes *TEMPRANILLO* (*TEM*) en la represión de la expresión de *FT*, contrarrestando la activación por parte de *CO*, en respuesta a fotoperiodo (Castillejo y Pelaz, 2008; Osnato et al., 2012). El gen *TEM1* reprime directamente la expresión de los genes *GA3-oxidase1* y *2* (*GA3OX1* y *GA3OX2*), por la unión a las regiones reguladoras localizadas en el primer exón de estos genes que participan en la ruta de biosíntesis de GAs (Osnato et al., 2012). Por tanto, parece que los genes *TEM* conectan la ruta del fotoperiodo y la ruta dependiente

de GAs, controlando la transición floral bajo fotoperiodos inductivos y no inductivos, a través de la regulación del integrador floral *FT* (Osnato et al., 2012).

Los integradores florales *SOC1* y *LFY* también suponen un importante punto de regulación a través de la ruta de las GAs, ya que la aplicación exógena de la hormona aumenta la expresión de estos genes promoviendo el inicio de la floración (Srikanth y Schmid, 2011). El análisis detallado de la región promotora de *LFY* identificó un elemento regulador *cis* que supone una secuencia consenso para la unión de los factores de transcripción tipo MYB-R2R3 (Blázquez y Weigel., 2000). En respuesta a GAs, la proteína MYB33 de *Arabidopsis* se une a estos elementos *cis*, activando la expresión de *LFY* e induciendo la floración (Gocal et al., 2001; Woodger et al., 2003; Achard et al., 2004; Srikanth y Schmid, 2011; Porri et al., 2012). La aplicación exógena de GAs también provoca el aumento en los niveles de transcripción de *AGL24* (Liu et al., 2008; Srikanth y Schmid, 2011). Por su parte, la proteína *SOC1* en colaboración con *AGL24*, regula la expresión de *LFY*, uniéndose directamente a su promotor y participan en el control de la floración a través de la ruta de las GAs, especialmente en DC (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008; Jung et al., 2011).

El represor de la floración y regulador negativo de *SOC1*, *SVP*, también parece estar regulado por GAs (Li et al., 2008). Los niveles de expresión de *SVP* descienden en plantas tratadas con GAs, mientras que los mutantes *ga1-3* muestran elevados niveles de *SVP*, si los comparamos con los de una planta silvestre (Srikanth y Schmid, 2011). Por tanto, las GAs regulan la expresión de *SOC1* a distintos niveles, ya que promueven la expresión de *AGL24*, a la vez que inhiben a represores florales como *SVP* (Li et al., 2008).

Por último, los genes *AGL42*, *AGL71* y *AGL72*, que codifican factores de transcripción tipo MADS-box, filogenéticamente relacionados con *SOC1*, también están implicados en la regulación de la transición floral. El integrador floral *SOC1* controla directamente la expresión de *AGL42*, *AGL71* y *AGL72* promoviendo la floración de forma diferencial, en el meristemo apical del tallo y en los meristemas axilares, a través de la ruta de las GAs (Dorca-Fornell et al., 2011).

- **RUTA DEPENDIENTE DE LA EDAD**

El estudio de la transición de la fase juvenil a la fase adulta, en plantas, ha revelado un importante papel de los factores de transcripción SPL y de los microRNAs, miR156 y miR172, en la regulación de la transición floral dependiente de la edad de la planta (Fornara y Coupland, 2009; Poethig, 2009; Amasino, 2010).

La expresión del miR156 se mantiene elevada durante la fase juvenil y retrasa la floración en *Arabidopsis* (Wu y Poethig, 2006), mientras que el miR172 muestra un patrón de expresión temporal contrario al del miR156. La expresión de miR172 es baja durante la fase juvenil y aumenta durante la fase adulta del desarrollo, promoviendo la iniciación de la floración (Chuck et al., 2007; Poethig, 2009; Wu et al., 2009a). El miR172 promueve la floración a través de un mecanismo de represión post-transcripcional de genes *AP2-like* como *TARGET OF EAT 1, 2 y 3 (TOE1, 2 y 3)*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* y *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*, que actúan como represores de *FT* (Aukerman y Sakai, 2003; Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2009).

Los factores de transcripción *SPL* se expresan en el meristemo en respuesta a la activación de *FT* y *FD*, y participan en el control del tiempo de floración a través de la regulación de la expresión de los integradores florales *SOC1* y *LFY* y de los genes de identidad del meristemo floral *AP1* y *FUL* (Fornara et al., 2009; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009a; Andrés y Coupland, 2012). Existe un circuito regulador formado por estos miRNAs y las proteínas SPLs. Durante la fase juvenil del desarrollo, las proteínas SPLs están silenciadas por el miR156 (Wu y Poethig, 2006). A su vez, las proteínas SPL9 y SPL10 son reguladores positivos de la expresión del miR172 (Wu et al., 2009a). De este modo, a medida que la planta se desarrolla, la expresión del miR156 disminuye y la expresión de las proteínas SPLs y de miR172 aumenta, promoviendo la transición floral (Fornara y Coupland, 2009; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009a). Además, el miR172 es regulado a través del reloj circadiano y participa en el control fotoperiódico de la floración mediante el aumento de la expresión de *FT* dependiente de *GI*, pero independientemente de la actividad de *CO* (Jung et al., 2007).

### 3. REGULACIÓN DE LA FLORACIÓN MEDIADA POR LOS INTEGRADORES FLORALES

Todas las rutas reguladoras de la floración anteriormente descritas convergen en la regulación de la expresión de los integradores florales *FT*, *TSF*, *SOC1*, *LFY* y *AGL24*, que a su vez regulan la expresión de genes específicos de la identidad del meristemo floral (Bernier y Périlleux, 2005; Turck et al., 2008; Lee y Lee, 2010). De los niveles de expresión de estos integradores depende el momento exacto en que se produce la transición floral (Lee y Lee, 2010) (Fig. 3).

#### 3.1. Los integradores florales *FT* y *TSF*

El integrador floral *FT* supone un importante punto de convergencia de diferentes señales ambientales, por lo que su expresión se encuentra fuertemente regulada, tanto a nivel espacial como temporal (Andrés y Coupland, 2012). Diversos estudios evidencian que las proteínas relacionadas con la modificación de la cromatina como SWR1-C, PRC2-C, LHP1/TFL2 y REF6/JMJ12, participan en la regulación de la expresión de *FT* (He, 2012).

La expresión de *FT* y de su homólogo *TSF*, que actúa de forma similar, se activa en el tejido vascular de las hojas (Andrés y Coupland, 2012). La proteína *FT* viaja a través del floema hasta el meristemo apical, donde participa en el inicio de la floración bajo condiciones ambientales óptimas para el crecimiento de la planta (Corbersier y Coupland, 2006; Andrés y Coupland, 2012). Tanto *FT* como *TSF* presentan perfiles de expresión similares a lo largo del día, que responden a variaciones del fotoperiodo. Al final de la tarde, el pico de expresión máxima de estos genes es mayor en DL, comparado con su expresión en DC (Yamaguchi et al., 2005). Tanto *FT* como *TSF* comparten reguladores como *CO* y *FLC* e integran señales provenientes de la ruta del fotoperiodo, la ruta autónoma y de vernalización, y de otros factores como *PHYB* y *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS)*, una proteína que reconoce marcas epigenéticas activadoras de la transcripción (Yamaguchi et al., 2005; Torti et al., 2012).

El locus *FT* presenta una región promotora de 5.7Kb aproximadamente, donde se encuentran todos los elementos necesarios para la regulación de su expresión espacial y temporal, en respuesta al fotoperiodo (Adrian et al., 2010). En condiciones de DL, *CO* se une al sitio de inicio de la transcripción, próxima a esta región promotora, activando la transcripción de *FT* (Andrés y Coupland, 2012). Otras proteínas que se unen al locus *FT* de forma directa son *GI*, *FKF1* y *CDF1* y participan en la ruta del fotoperiodo, a través de



la regulación de la expresión del mRNA de *CO* (Sawa et al., 2007; Sawa y Kay, 2011; Song et al., 2012). Como señalábamos anteriormente, el factor de transcripción *CIB1* también se une a la región promotora de *FT*, activando su expresión en respuesta a la luz azul (Liu et al., 2008b). Además de la respuesta al fotoperiodo, la expresión de *FT* responde al aumento de la temperatura ambiente a través de la proteína *PIF4* y del *SWR1-C* (Kumar y Wigge, 2010; Kumar et al., 2012; He, 2012).

También existen múltiples represores que regulan la expresión de *FT*. Entre ellos se encuentran las proteínas *LHP1/TFL2*, *CDF1*, *SVP* y *FLC*, que se unen a las regiones promotoras y/o al primer intrón reprimiendo directamente la expresión de *FT* (Helliwell et al., 2006; Searle et al., 2006; Lee et al., 2007; Song et al., 2012). También regulan negativamente la expresión de *FT*, los factores de transcripción tipo AP2-like, *TEM1* y *TEM2* (Castillejo y Pelaz, 2008). El balance entre la expresión de los genes *CO* y *TEM* supone un importante mecanismo de control de la transcripción de *FT*, particularmente en plantas jóvenes (Castillejo y Pelaz, 2008). Otras proteínas tipo AP2-like como *AP2*, *TOE1*, *TOE2*, *SNZ* y *SMZ* reprimen la expresión de *FT* a través de la ruta dependiente de la edad (Kim et al., 2006; Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010; Srikanth y Schmid, 2011; Wang et al., 2011).

Una vez en el meristemo apical, la proteína *FT* al igual que *TSF*, se asocian con la proteína *FD*, donde forman un complejo que activa la expresión de multitud de genes fundamentales para promover la floración (Porri et al., 2012). Entre ellos, se encuentran los genes *SOC1* y *SPLs*, que activan su expresión en respuesta a DL y en respuesta a la edad de la planta, respectivamente (Jung et al., 2011; Porri et al., 2012; Torti et al., 2012). Ambos factores de transcripción convergen en la activación de los genes de identidad de meristemo floral *FUL*, *LFY* y *AP1*, promoviendo la floración (Wang et al., 2011).

La actividad de *FT* está principalmente regulada en DL por *CO*, a través de la ruta del fotoperiodo. Sin embargo, la ruta de vernalización, la ruta dependiente de la temperatura ambiental, de las giberelinas y de la edad de la planta, también convergen en este integrador floral (Andrés y Coupland, 2012). Por otro lado, las proteínas *FT* y *TSF* en el floema, presentan un papel redundante en la promoción de la floración, a través de la regulación dependiente de GAs en condiciones de DL (Porri et al., 2012). Se ha sugerido que los mecanismos por los cuales las GAs regulan la expresión de estos integradores florales, están promovidos por una acumulación de las proteínas *DELLA*, que reprimen los factores necesarios para la correcta expresión de *FT* y *TSF*.

(Porri et al., 2012). Bajo fotoperiodos inductivos, la señalización de las GAs promueve la activación de la transcripción de *FT* en las hojas, y de *SOC1* y *SPL*, en el meristemo (Reeves y Coupland, 2001; Hisamatsu y King, 2008; Jang et al., 2009; Porri et al., 2012). Sin embargo, la sobreexpresión de *TSF* origina un fenotipo de floración temprana independientemente del fotoperiodo, de la regulación por *CO* o de *FLC* (Yamaguchi et al., 2005). Estas observaciones demuestran que aunque *TSF* presenta un papel similar al de *FT* en la ruta del fotoperiodo, también contribuye de forma diferenciada a la inducción de la floración, en condiciones de DC (Yamaguchi et al., 2005; Hiraoka et al., 2012).

### 3.2. El Integrador floral *SOC1*

El gen *SOC1* es un factor de transcripción tipo MADS box cuya expresión está regulada por todas las rutas inductoras de la floración, bien de forma directa, como es el caso de la ruta dependiente de la edad y de la ruta de las giberelinas, o bien de forma indirecta, a través de *FT* o de *FLC* (Lee y Lee, 2010).

En respuesta al fotoperiodo, *CO* regula positivamente a *SOC1*, a través de *FT* (Lee y Lee, 2010). El complejo FT-FD activa la expresión de *SOC1* en el meristemo, que se une a la proteína *AGL24* y juntos activan la expresión de *LFY* (Lee y Lee, 2010). *AGL24* y *SOC1* promueven la floración a través de un bucle de activación transcripcional, ya que cada uno de ellos es capaz de activar la expresión del otro, y ambos activan la expresión del gen *LFY* (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008a). Después de la activación de *SOC1*, rápidamente se induce en el meristemo la expresión de otros genes de floración (Liu et al., 2007a, 2009; Melzer et al., 2008; Lee y Lee, 2010). Concretamente los genes *SPL3*, *SPL4* y *SPL5* son dianas directas de *SOC1* y del complejo FT-FD (Jung et al., 2011). Por su parte, *SPL9* aumenta su expresión conforme aumenta la edad de la planta y se une al primer intrón de *SOC1*, activando su expresión (Wang et al., 2009). Los genes *SPL*, además de *SOC1*, también requieren de la función de FT, *TSF*, *LFY* y *FUL*, para su correcta expresión (Schmid et al., 2003; Porri et al., 2012; Torti et al., 2012). Por tanto, se producen una serie de interacciones entre *SOC1*, *AGL24*, *SPLs* y los genes de identidad del meristemo floral, que promueven la floración bajo condiciones de DL, en el meristemo apical del tallo (Srikanth y Schmid, 2011; Porri et al., 2012).

Finalmente, el represor *FLC* también se une directamente a los promotores de *SOC1* y *FD*, así como al primer intrón de *FT* y reprime la expresión de *FT* en la hoja y de

*SOC1* y *FD* en el meristemo apical (Helliwell et al., 2006; Searle et al., 2006). De forma similar, se ha descrito que *SVP* se une a la cromatina de *FT* y de *SOC1*, reprimiendo su expresión (Lee et al., 2007; Li et al., 2008; Amasino, 2010).

### 3.3. El Integrador floral *AGAMOUS-LIKE 24*

El locus *AGL24* codifica un factor de transcripción tipo MADS box que actúa como un activador floral de forma similar a *SOC1* (Michaels et al., 2003). Las proteínas *AGL24* y *SOC1* forman un heterodímero que se une al promotor de *LFY*, participando en la localización nuclear y en la regulación transcripcional de dicho locus (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008; Jung et al., 2011). Además, las proteínas *AGL24* y *SVP* regulan de forma positiva a *AP1* y *LFY* por la unión directa a sus regiones promotoras (Grandi et al., 2012).

El nivel de expresión de *AGL24* depende de la ruta del fotoperiodo, de la vernalización, de las GAs y de la ruta autónoma. Sin embargo, a diferencia de *SOC1*, la regulación de *AGL24* es independiente de *FLC* (Lee y Lee, 2010; Srikanth y Schmid, 2011). Recientemente se ha demostrado que la expresión de *AGL24* es detectada en el meristemo apical del tallo bajo condiciones de DC y que esta expresión se incrementa en DL (Torti et al., 2012). Mutaciones en *AGL24* retrasan la floración de dobles mutantes *soc1 ful*, sugiriendo que la floración es controlada por *AGL24* de forma parcialmente independiente a *SOC1* y *FUL* (Torti et al., 2012).

Además de la regulación de la floración, *SOC1* y *AGL24* participan en la represión del desarrollo precoz de los órganos florales mediante la represión de la expresión del gen de identidad de meristemo floral, *SEP3*, asegurando de esta manera un adecuado control espacio-temporal de la floración (Lee y Lee, 2010).

### 3.4. El Integrador floral *LEAFY*

Aunque *LFY* participa en la determinación de la identidad del meristemo floral, se ha demostrado que el locus *LFY* también está implicado en la transición floral (Weigel y Nilsson, 1995; Blázquez et al., 1997) e integra señales procedentes de la ruta autónoma, la ruta dependiente de la edad y de las GAs (Blázquez et al., 1998; Yamaguchi et al., 2009). Además, se han detectado significativos niveles de expresión del mRNA de *LFY* en los primordios de las hojas jóvenes, sugiriendo su participación durante el desarrollo vegetativo (Srikanth y Schmid, 2011). Como ya hemos

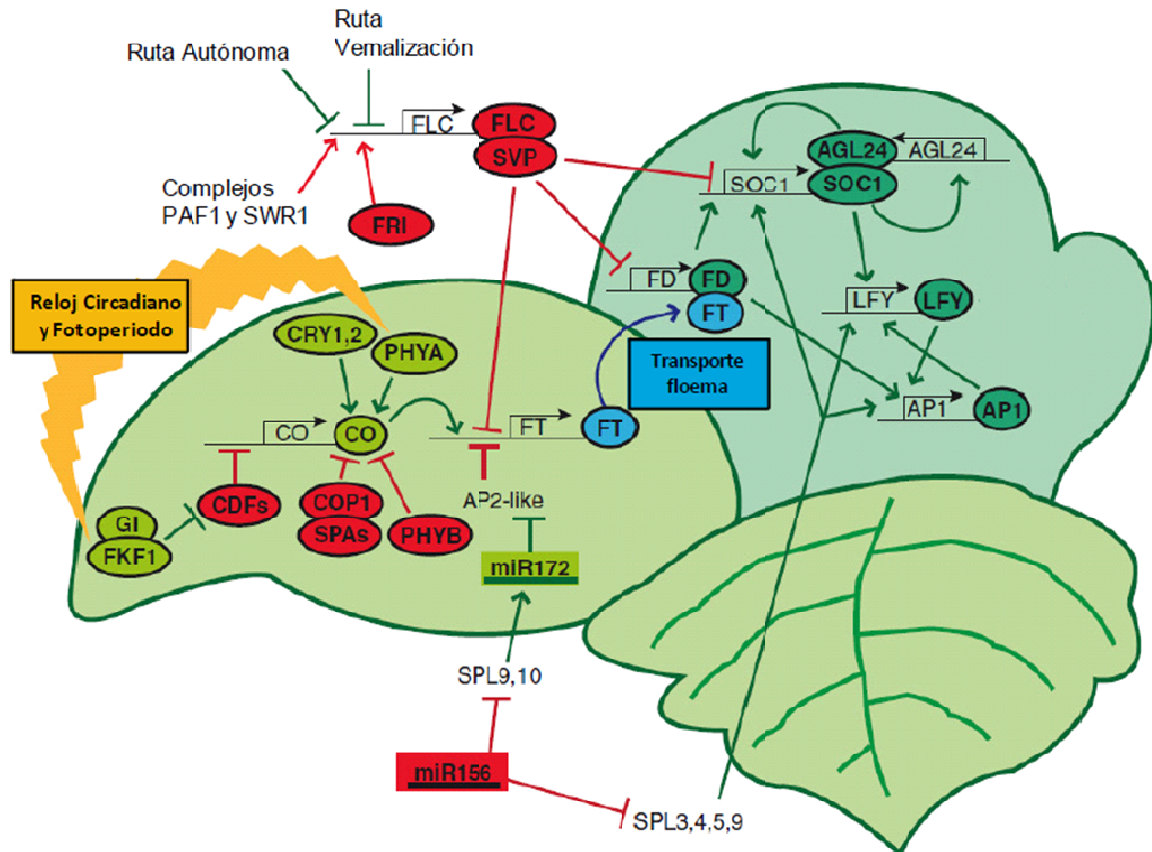
mencionado, *LFY* se encuentra regulado por el factor transcripcional LD que participa en la ruta autónoma y es una diana directa de los integradores florales *SOC1* y *AGL24* (Lee et al., 2008). Además, la expresión de *LFY* se encuentra regulada por la ruta dependiente de la edad y de las GAs, mediante la acción de las proteínas SPLs y del miR156 (Eriksson et al., 2006; Lee et al., 2008; Srikanth y Schmid, 2011). La señalización mediante GAs origina un descenso de las proteínas DELLA, represoras de miR159, que a su vez inhibe la acción de las proteínas MYB. Por tanto, las GAs, promueven la regulación positiva de *LFY* en el meristemo, a través de la regulación de las proteínas MYB que se unen a su promotor (Srikanth y Schmid, 2011).

La proteína *LFY* junto a *AP1*, es responsable del paso de la producción de estructuras vegetativas a la producción de estructuras reproductivas, confiriendo identidad a los primordios florales (Bowman et al., 1993; Pastore et al., 2011). Recientemente se ha demostrado que *LFY* interacciona con la proteína LATE MERISTEM IDENTITY2 (*LMI2*) participando de forma conjunta en la activación de *AP1* (Pastore et al., 2011). Por tanto, *LFY*, *AP1* y *LMI2*, se encuentran conectados en un bucle de retroalimentación positiva que participa en la formación de los meristemas florales. La proteína *LFY* también actúa como represor de *AGL24* y *SVP* (Grandi et al., 2012). Por lo tanto, el integrador genético *LFY* se encuentra regulado por multitud de señales que inciden sobre la planta y presenta una función dual, ya que participa en la regulación del tiempo de floración y en el desarrollo del meristemo floral (Srikanth y Schmid, 2011).

Los mecanismos de activación de los genes de identidad de meristemo floral mediados por los integradores florales, aseguran que, una vez que se ha iniciado la floración, ésta se mantenga aún en ausencia de los estímulos ambientales que la desencadenaron (Kim et al., 2009).

*FT* y *SOC1* son responsables de la activación de los genes de identidad de meristemo floral como *LFY*, *AP1*, *AP2*, *CAL* y *FUL* (Ausín et al., 2005). Estos genes se expresan esencialmente en los primordios laterales del meristemo apical del tallo, donde se forman las flores. Recientemente se ha sugerido un importante papel del balance entre los genes que regulan el tiempo de floración y los genes de identidad del meristemo floral en el mantenimiento de la identidad de la flor (Yu et al., 2004; Liu et al., 2007a, 2009). Los genes *SOC1*, *AGL24* y *SVP* actúan de forma redundante en el mantenimiento de la identidad del primordio. Sin embargo, la represión directa de *AGL24*, *SOC1* y *SVP* por parte de *AP1* previene la continuidad del desarrollo del tallo,

contribuyendo a la especificación de identidad del meristemo floral (Yu et al., 2004; Liu et al., 2007a; Lee y Lee, 2010). Cuando se establece la identidad del meristemo floral se producen los órganos florales de acuerdo al modelo ABC (Coen y Meyerowitz, 1991), donde los genes de identidad de órgano floral, A, B y C, funcionan para producir los sépalos, pétalos, carpelos y estambres que componen las flores (Lee y Lee, 2010).



**Fig. 3. Esquema general de la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis*.** Se representan los genes, proteínas (óvalos) y miRNAs que están implicados en este proceso. Las flechas indican inducción o estabilización, mientras que las líneas cruzadas con una barra perpendicular indican represión o degradación. Los componentes que promueven la floración se representan en color verde y los que la reprimen, en color rojo (adaptado de Amasino, 2010).

#### 4. REPRESIÓN DE LA FLORACIÓN

Además de las rutas implicadas en la promoción de la floración, durante los últimos años se han caracterizado multitud de genes y de mecanismos moleculares implicados en la represión de la transición floral, que se han puesto de manifiesto a partir del estudio de mutantes con fenotipo de floración temprana (Sung et al., 2003; Pouteau et al., 2004, 2006; Jarillo y Piñeiro, 2011).

##### 4.1. Integración de los represores florales en las distintas rutas inductoras de la floración

Entre los mutantes tempranos aislados, algunos están relacionados con la transmisión de la señal de la luz como *thy1*, en el caso de la luz roja lejana, y *phytochrome signalling early flowering 1 (pef1)*, afectado en la transmisión de la luz roja y de luz roja lejana (Jiao et al., 2007). Los mutantes tempranos *phyB* descritos anteriormente, están afectados en la percepción o la transducción de señales como la luz y la temperatura ambiente (Goto et al., 1991; Srikanth y Schmid, 2011). Por otro lado, se han identificado mutantes afectados en el funcionamiento del reloj circadiano, bien por presentar alteraciones en la regulación de las vías de entrada al reloj, como *sensitivity to the red light reduced 1 (srr1)* o porque afectan a componentes del oscilador central del reloj, como *timing of cab expression1 (toc1)* y *elf4* (Jarillo et al., 2008).

Existen otros represores de la floración que participan regulando la expresión de CO en Arabidopsis. Entre ellos se encuentran las proteínas CDFs, DAY NEUTRAL FLOWERING (DNF), LONG VEGETATIVE PHASE 1 (LOV1), RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2 (RFI2), SENSITIVE TO FREEZING 6 (SFR6) y HOS1 (Chen y Ni, 2006; Yoo et al., 2007; Knight et al., 2008; Morris et al., 2010; Lázaro et al., 2012). La E3 ubiquitín-ligasa, DNF, participa en el mantenimiento de niveles de expresión de CO bajos, entre 4 y 7 horas después del amanecer en condiciones de DC y es una proteína esencial en la respuesta de Arabidopsis al fotoperiodo (Morris et al., 2010). Por su parte, la proteína CDF1 tiene la capacidad de unirse al promotor de CO, inhibiendo su expresión en condiciones de DL en las hojas de Arabidopsis (Song et al., 2010). Otros factores relacionados, como CDF2, CDF3 y CDF5 presentan una función redundante, por lo que también retrasan la floración, mediante la regulación negativa de CO (Fornara et al., 2009; Morris et al., 2010).

En los últimos años se han descrito otra serie de mutantes tempranos que han puesto de manifiesto la existencia de diversos mecanismos moleculares implicados en la degradación selectiva de proteínas. Entre ellos se encuentran los mutantes *hos1* (Lázaro et al., 2012), *cop1* (Valverde et al., 2004) y los mutantes de la familia *SPA* (Liu et al., 2008), que afectan a la estabilidad de CO. El complejo COP1-SPA1 promueve la eliminación de CO en oscuridad (Zuo et al., 2012), mientras que la proteína HOS1 colabora en la degradación de CO durante la mañana (Lázaro et al., 2012). De igual manera, mutantes *early in short days 4 (esd4)* afectados en una sumo-proteasa (Murtas et al., 2002), o mutantes *siz1*, alterados en una proteína con actividad E3 sumo-ligasa, también florecen de forma prematura (Miura et al., 2005; Jin et al., 2008).

Por otro lado, se han identificado mutantes afectados en el funcionamiento del reloj circadiano, que también presentan alteraciones en la regulación termosensible de la floración en *Arabidopsis*, como *elf3* (Strasser et al., 2009). La proteína ELF3 que forma parte del complejo EC (Evening Complex), participa en la regulación de la floración a través de la ruta del fotoperiodo (Yu et al., 2008b; Nusinow et al., 2011). El complejo formado por ELF3 y COP1 en respuesta a la luz, promueve la degradación de GI impidiendo la floración (Yu et al., 2008).

El locus *TFL1* también está implicado en la regulación de la floración en respuesta a la temperatura ambiente. Se ha propuesto que TFL1 compite con FT por regular FD en el meristemo apical del tallo y ejerce un efecto negativo sobre la expresión los genes de identidad de meristemo floral *AP1* y *LFY* (Giakountis y Coupland, 2008). Sin embargo, estos genes también reprimen la expresión de *TFL1* en los meristemos florales jóvenes. (Giakountis y Coupland, 2008; Strasser et al., 2009; Andrés y Coupland, 2012).

También se han descrito una serie de represores que ejercen una acción directa sobre la expresión de *FT*. Entre ellos se encuentran las proteínas LHP1/TFL2, CDF1, SMZ, TEM1, TEM2, SVP y FLC, que tienen la capacidad de unirse a ciertas regiones reguladoras de *FT*, reprimiendo directamente su expresión (Helliwell et al., 2006; Searle et al., 2006; Lee et al., 2007).

En *Arabidopsis* algunos represores de tipo AP2-like inhiben la expresión de *FT* a través de la ruta dependiente de la edad de la planta (Srikanth y Schmid, 2011; Wang et al., 2011). Estas son las proteínas AP2, TOE1, TOE2, SNZ y SMZ (Kim et al., 2006; Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010; Srikanth y Schmid, 2011; Wang et al., 2011;

Andrés y Coupland, 2012). La proteína AP2 participa en el control de la floración de dos maneras diferentes, por un lado reprime la expresión del integrador floral *SOC1* y por otro, activa la expresión de otros reguladores como AGL15, que participa en el reclutamiento de complejos deacetilasas de histonas y es funcionalmente redundante con AGL18, en la represión de la floración (Adamczyk et al., 2007; Hill et al., 2008; Yant et al., 2010). Por su parte, la proteína SMZ se une a una región localizada 1.5Kb por detrás del codón stop de *FT* (Mathieu et al., 2009; Andrés y Coupland, 2012).

De igual forma, otros factores de transcripción tipo AP2-like, como TEM1 y TEM2, que participan en las rutas de regulación dependientes del fotoperiodo y de GAs, reprimen la expresión de *FT* de una forma directa, mediante la interacción con ciertas regiones reguladoras de dicho locus (Castillejo y Pelaz, 2008; Mathieu et al., 2009).

Entre los represores florales que actúan a través de la ruta de las GAs, se encuentra *SPY*, cuya mutación origina un fenotipo de floración temprana. También las proteínas DELLA, que como ya hemos mencionado, actúan como reguladores negativos de la floración a través de la ruta de GAs e interactúan directamente con los factores de transcripción PIFs (De Lucas et al., 2008; Schwechheimer y Willige, 2009). En *Arabidopsis* se han identificado 5 genes tipo *DELLA* y al menos 3 de ellos participan como reguladores negativos de la floración, en ausencia de GAs, *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR-OF-ga1-3 (RGA)* y *RGA-LIKE1 (RGL1)* (Mouradov et al., 2002; Jarillo y Piñeiro, 2011). Por su parte, las proteínas GNC y GNL reprimen la floración en ausencia de GAs, ya que son reguladas negativamente por esta hormona (Richter et al., 2010).

Por último, FLC y SVP forman un complejo responsable de la inhibición directa de la expresión de *FT* y *SOC1*, en respuesta a cambios en la temperatura ambiental (Li et al., 2008). Otros represores como *MAF1/FLM*, reprimen la expresión de *FT* bajo condiciones de DC (Sheldon et al., 2009; Zografos y Sung, 2012).



## 4.2. Represión de la floración dependiente de modificaciones a nivel epigenético

Se han propuesto tres mecanismos principales de remodelación de la estructura de la cromatina implicados en la represión floral:

- i. Modificaciones covalentes post-transcripcionales de histonas y del DNA (March-Díaz et al., 2008; Altaf et al., 2009, Lee et al., 2010).
- ii. El desplazamiento o la reorganización de los nucleosomas sobre el DNA, mediante la acción de complejos remodeladores dependientes de ATP (Clapier y Cairns, 2009).
- iii. Intercambio de histonas por otras variantes histónicas, originando regiones genómicas con una estructura y función diferenciadas (Altaf et al., 2009).

Además, como hemos comentado anteriormente, se han propuesto otros mecanismos que regulan la expresión génica mediante la síntesis de RNAs no codificantes o la formación de bucles en el cromosoma (Chan, 2008; Álvarez et al., 2010; Crevillén et al., 2012).

### 4.2.1. Activación de la expresión de *FLC*

A partir del estudio de una serie de mutantes tempranos afectados en reguladores específicos de la expresión de *FLC*, se han podido identificar diferentes mecanismos remodeladores de la cromatina implicados en la represión floral. En los estados iniciales del desarrollo de la planta, se establecen niveles elevados de expresión de *FLC* que se mantienen durante la fase de desarrollo vegetativo, impidiendo un cambio prematuro a la fase de desarrollo reproductivo y propiciando la floración en el momento más adecuado (Kim et al., 2009; Song et al., 2012) (Fig.4).

En primer lugar, la monoubiquitinación de la lisina 123 de la histona H2B (H2Bub1) es una marca asociada a la activación de la expresión génica (Wood et al., 2003). En levaduras, un complejo formado por la enzima E2 conjugadora de ubiquitina, RAD6, y la E3 ligasa de ubiquitina, BRE1, participa en la monoubiquitinación de la histona H2B de genes específicos (Wood et al., 2003). En *Arabidopsis* existen tres homólogos de *RAD6*, que son *UBIQUITIN CONJUGATING ENZIME 1 (UBC1)*, *UBC2* y *UBC3* y dos homólogos de *BRE1*, denominados *HISTONE MONOUBIQUITINATION1 (HUB1)* y *HUB2* (Fleury et al., 2007; Liu et al., 2007; Xu et al., 2009). Se ha propuesto que UBC1 y

UBC2 funcionan de forma redundante y, junto con el tetrámero formado por dos moléculas de HUB1 y dos de HUB2, participan en la monoubiquitinación de H2B, necesaria para iniciar la transcripción de *FLC* (Berr et al., 2011).

Otra marca característica del estado transcripcionalmente activo de *FLC* consiste en elevados niveles de trimetilación en H3K4 y H3K36 (He y Amasino, 2005). Algunas de las proteínas responsables de introducir estas marcas epigenéticas en la cromatina pertenecen a la familia de proteínas TrxG (Trithorax group) (Liu et al., 2010a). Entre ellas, se encuentran ARABIDOPSIS TRITHORAX LIKE1 (ATX1), ATX2, ARABIDOPSIS TRITHORAX LIKE-RELATED3 (ATXR3) y ATXR7, implicadas en la trimetilación de H3K4 y SET DOMAIN GROUP 8/EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (SDG8/EFS), implicada en la trimetilación de H3K36 en *FLC*, en el contexto del complejo COMPASS-like de Arabidopsis (Cartagena et al., 2008; Thorstensen et al., 2008; Berr et al., 2009; Tamada et al., 2009; He, 2012). Mutaciones en *ATX1*, además de originar un fenotipo de floración temprana, provocan defectos en el desarrollo de las hojas y en la resistencia de la planta a la infección por patógenos (Álvarez-Venegas et al., 2003; Álvarez-Venegas y Avramova, 2005). En el caso del gen *SDG8/EFS*, que codifica la principal metiltransferasa de H3K36 en Arabidopsis, su mutación causa una aceleración en el tiempo de floración y un fenotipo muy pleiotrópico (Cazzonelli et al., 2009). Esta proteína contiene un dominio SET en su extremo carboxilo-terminal y un dominio CW en su extremo amino-terminal que reconoce diferentes estados metilados de H3K4, preferentemente mono- y dimetilados (Hoppmann et al., 2011). La proteína SDG8/EFS es necesaria para la introducción de las marcas H3K36me<sub>2/3</sub> específicas y para activar la expresión de *FLC* y de los genes *MAFs* (Xu et al., 2008).

En levaduras, el PAF1-C se asocia con la RNA polimerasa II y promueve la transcripción mediante el reclutamiento de las metiltransferasas SET1, específica de H3K4, y SET2, específica de H3K36, que forman parte del COMPASS-C (Berr et al., 2011). Un mecanismo similar parece estar conservado en Arabidopsis, ya que en mutantes para alguna de las subunidades del PAF1-C descritas, con un fenotipo de floración acelerada, la reducción de *FLC* se relaciona directamente con un descenso de H3K4me<sub>3</sub> y H3K36me<sub>3</sub> (Yu y Michaels, 2010). De hecho, en Arabidopsis se han identificado homólogos para los componentes de ambos complejos. Entre ellos se encuentran los componentes del PAF1-C, *VIP2/ELF7*, *VIP3*, *VIP4*, *VIP5*, *VIP6/ELF8* y *PHP/CDC73* (Park et al., 2010b; Yu y Michaels, 2010). Por su parte, el complejo COMPASS (COMPASS-C) está constituido por las subunidades ATX1, ATX2, ATXR7, WDR5 HOMOLOG A (WDR5a), RbBP5 LIKE (RBL), ARABIDOPSIS Ash2 RELATIVE

(ASH2R) y SDG8/EFS (Jiang et al., 2011; Kim y Sung, 2011). Todas estas subunidades son necesarias para la correcta expresión de *FLC* y de los genes de la familia *MAF* (Zhang et al., 2003; He et al., 2004). Por tanto, podría existir en *Arabidopsis* un PAF1-C que reclute a la metiltransferasa de histonas SDG8/EFS, componente del COMPASS-C, permitiendo la participación coordinada de ambos complejos en la activación de la transcripción de *FLC* mediante el aumento de la metilación en H3K4 y H3K36, previa a la respuesta a vernalización (Krogan et al., 2003; Kim y Sung, 2011). Recientemente se ha demostrado que SDG8/EFS posee una doble actividad sobre la activación de *FLC*, por un lado actúa como una enzima metiltransferasa de histonas y por otro, recluta un complejo activador de *FLC*, que contiene a FRI (Ko et al., 2010; Choi et al., 2011).

La transcripción de *FLC* es activada por FRI, a través de un mecanismo co-transcripcional que implica su interacción directa con componentes del complejo de unión al extremo 5' de la estructura denominada caperuza o casquete (5'CAP) del mensajero de *FLC* (Geraldo et al., 2009; Crevillén et al., 2012). Por otro lado, se ha descrito que FRI también puede actuar formando parte de un complejo FRIGIDA (FRI-C) compuesto por las proteínas FRI-LIKE1 (FRL1), FRI-LIKE2 (FRL2), FRIGIDA ESSENTIAL1 (FES1), SUF4 y FLC EXPRESSOR (FLX) (Choi et al., 2011; Kim y Sung, 2011). Todos los componentes de este complejo son necesarios para la función de FRI, ya que mutaciones en algunas de estas proteínas eliminan la capacidad para activar la expresión de *FLC* en presencia de FRI (Choi et al., 2011). El FRI-C se une preferentemente a la región promotora de *FLC* y requiere de diferentes remodeladores de cromatina como SDG8/EFS, los complejos de ubiquitinación/desubiquitinación de H2B, del PAF1-C y del SWR1-C, para su correcto funcionamiento en los mecanismos represores de la floración (Kim et al., 2009; Berr et al., 2011; Choi et al., 2011).

En estudios realizados en eucariotas, la marca H3K4me3 se encuentra enriquecida generalmente alrededor del sitio de inicio de la transcripción, mientras que las marcas H3K36me3 y H2Bub1 se encuentran localizadas preferentemente en la primera mitad de la región codificante y en la región transcrita, respectivamente, de aquellos genes cuya transcripción se encuentra activada (Berr et al., 2011; Roudier et al., 2011). La modificación H2Bub1 es un importante prerrequisito para el aumento de los niveles de H3K4me3 y para la activación transcripcional de los genes diana en otros organismos (Wood et al., 2003). En el caso de *Arabidopsis*, se ha demostrado que la introducción de H2Bub1 es necesaria para el aumento de las marcas H3K4me3 y H3K36me2 a lo largo de la cromatina de *FLC*, para su correcta activación transcripcional (Cao et al., 2008). Igualmente, la desubiquitinación de H2B es necesaria para la

acumulación de H3K36me3 en la cromatina de *FLC* y para promover su expresión (Schmitz et al., 2009). Por tanto, la distribución de H2Bub1 refleja el cambio dinámico del estado ubiquitinado al desubiquitinado de H2B, que se produce durante la activación transcripcional, en genes que se expresan a elevados niveles (Berr et al., 2011).

Por su parte, el SWR1-C utiliza la energía de la hidrólisis de ATP para promover el intercambio de la histona H2A por la variante histónica H2A.Z y desestabilizar la estructura de los nucleosomas (Martin-Trillo et al., 2006; March-Díaz et al., 2008). El papel que juega H2A.Z en la regulación de la expresión génica es controvertido, puesto que se encuentra tanto en zonas de heterocromatina como en zonas transcripcionalmente activas en distintos organismos (Draker y Cheung, 2009). En *Arabidopsis* se han identificado varias proteínas homólogas a los componentes del SWR1-C de levaduras, que participan en la activación transcripcional de *FLC* (Choi et al., 2005; Deal et al., 2005, 2007; Kandasamy et al., 2005a; Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008). Algunas de estas subunidades identificadas en *Arabidopsis* han sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, por lo que el SWR1-C será descrito más detalladamente en el siguiente apartado.

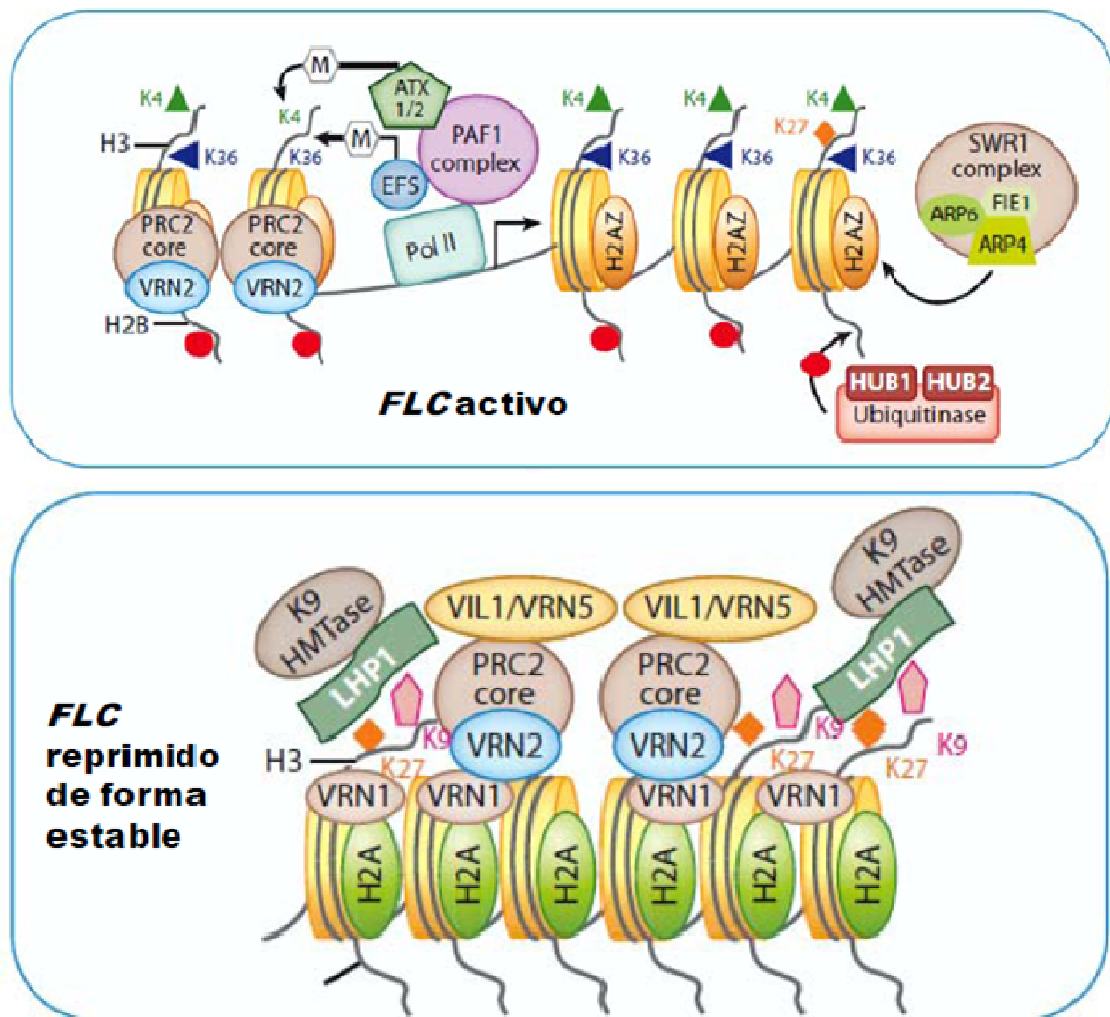


Fig.4. Regulación epigenética del gen *FLC* (adaptado de Kim et al., 2009).

#### 4.2.2. Otros represores florales implicados en mecanismos de remodelación de la cromatina

Los procesos de remodelación de cromatina también participan en la represión de la floración mediante la regulación de otros genes implicados en el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis* (Wagner, 2003). Recientes estudios demuestran la existencia de diversos modificadores de la cromatina implicados en la regulación de la expresión de *FT*, incluidos LHP1/TFL2, EBS, PRC2-C y las desmetilasas REF6/JMJ12 y PKDM7B/ JMJ14 (He, 2012).

Mutaciones en los loci *EBS* y *LHP1/TFL2* causan una aceleración de la floración en condiciones de fotoperiodos no inductivos ya que ambas proteínas son necesarias para reprimir la activación de *FT* mediada por *CO* (Piñeiro et al., 2003; Takada y Goto,

2003). Los genes *EBS* y *LHP1/TFL2* también regulan la expresión de genes de identidad de órgano floral (Kotake et al., 2003; Takada y Goto, 2003; Libault et al., 2005; Nakahigashi et al., 2005; Germann et al., 2006). *EBS* es una proteína nuclear, específica de plantas, que contiene un dominio BAH (Bromo Adjacent Homology) y un dominio PHD (Piñeiro et al., 2003). Ambos dominios están presentes en factores remodeladores de la cromatina. Existen evidencias de que *EBS* participa en el reconocimiento de la marca H3K4me3 en la cromatina de *FT* y podría reclutar complejos con actividad deacetilasa de histonas, reprimiendo la expresión de dicho gen (López-González et al., 2013 en revisión).

Por su parte *LHP1/TFL2*, además de participar en el silenciamiento estable de *FLC* en respuesta a vernalización, formando parte del complejo PRC1-like de *Arabidopsis*, también reconoce la modificación H3K27me3 y es dirigida a las regiones promotoras y transcritas del gen *FT* para reprimir su expresión (Turck et al., 2007). Otros componentes del complejo PRC1-like, como *EMF1*, también participa en la represión de *FT* y en el mantenimiento del estado reprimido de *AG* (Moon et al., 2003b; Bratzel et al., 2010). Asimismo, los componentes del PRC2-C, *CLF*, *SWINGER* (*SWN*), *EMF2* y *FIE*, participan en la regulación negativa de *FT* (Jiang et al., 2008; Liu et al., 2010a; Farrona et al., 2011). La proteína *CLF* se une a la cromatina de *FT* y es necesaria para la trimetilación de H3K27 (Jiang et al., 2008). Estos datos sugieren que PRC2-C deposita H3K27me3 sobre la cromatina de *FT* y actúa en cooperación con el complejo PRC1-like para reprimir la expresión de este locus e inhibir la floración (He, 2012). Por otro lado, las proteínas *CLF* y *EMF2*, mediante mecanismos dependientes del PRC2-C, actúan reprimiendo la expresión de *AGL19*, una proteína tipo MADS box que actúa como un inductor floral (Schonrock et al., 2006; Jiang et al., 2008).

Recientemente se ha demostrado que los niveles de trimetilación de H3K27 son controlados de una forma dinámica por el PRC2-C y la proteína *REF6/JMJ12*, así *REF6/JMJ12* desmetila específicamente la marca H3K27me2/3, permitiendo la expresión de *FT* (Lu et al., 2011; He, 2012). De la misma manera, la actividad metiltransferasa de histonas sobre la cromatina de *FLC* es equilibrada por la actividad desmetilasa de *REF6/JMJ12*, específica de H3K4 y H3K36 y de *FLD*, específica de H3K4 (Ko et al., 2010).

En *Arabidopsis* se han caracterizado varias proteínas de tipo *JMJ*, con actividad desmetilasa de histonas (Lu et al., 2008). Entre ellas se encuentran las proteínas *REF6/JMJ12* y su homólogo *EARLY FLOWERING 6 (ELF6)/JMJ11*. Los mutantes *ref6* y

*elf6* presentan un fenotipo de floración tardía y acelerada, respectivamente (Noh et al., 2004). Asimismo, mutaciones en dichos loci originan una reducción de la expresión de genes relacionados con brasinosteroides, asociada a un aumento de H3K9me3, sugiriendo que tanto ELF6/JMJ11 como REF6/JMJ12 podrían estar funcionando también como desmetilasas de H3K9 (Yu et al., 2008). Por otro lado, las proteínas MJM15/MEE27 y PKDM7B/JMJ14 son capaces de revertir la mono-, di y trimetilación de H3K4 (Liu et al., 2010; Lu et al., 2010). La cromatina de *FT* puede contener simultáneamente la marca de transcripción activa, H3K4me3 y la marca represiva H3K27me3 (Jiang et al., 2008). La marca H3K27me3 introducida por PRC2-C, es necesaria para reprimir la expresión de *FT*, pero no elimina la marca H3K4me3 de la cromatina de este gen y viceversa (Jiang et al., 2008). No obstante, La pérdida de función de PRC2-C no solo elimina la marca H3K27me3 sino que también produce un aumento de H3K4me3 en *FT* (Jiang et al., 2008). La desmetilasa PKDM7B/JMJ14 se une a la cromatina de *FT* y desmetila H3K4 específicamente, inhibiendo la expresión de dicho locus (Jeong et al., 2009; Lu et al., 2010; Yang et al., 2010). Los mutantes *jmj14* presentan un fenotipo de floración temprana, independiente de *FLC*, debido al aumento de H3K4me3 y a la reducción de la marca H3K27me3 en la cromatina de *FT* (Jeong et al., 2009; Deleris et al., 2010; Liu et al., 2010; Searle et al., 2010; Yang et al., 2010). Por tanto, las modificaciones epigenéticas H3K4me3 y H3K27me3 actúan de forma antagónica en el locus *FT*, y los niveles de H3K4me3 frente a los de H3K27me3, juegan un papel crítico en la regulación de la expresión de dicho gen (He, 2012).

Por su parte, la proteína BRAHMA (BRM), de la familia SNF2, reprime la transición floral inhibiendo la activación de *CO*, *FT* y *SOC1* (Farrona et al., 2004), sin embargo esta proteína también es capaz de reprimir la expresión de *FLC* (Farrona et al., 2011). En los mutantes *brm*, la expresión de *FLC* es elevada, los niveles de H3K4me3 presentes en la cromatina de dicho locus aumentan, mientras que los de H3K27me3 disminuyen. Estos datos indican que BRM impone una configuración inactiva de la cromatina en el locus de *FLC* (Farrona et al., 2011)

Otros de los mutantes que presentan fenotipo de floración temprana están afectados en factores relacionados con la replicación del DNA y muestran alteraciones en procesos de silenciamiento transcripcional (Elmayan et al., 2005; Kapoor et al., 2005a, 2005b; Xia et al., 2006; Barrero et al., 2007; Del Olmo et al., 2009). Así por ejemplo, *INCURVATA 2 (ICU2)* codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa alpha ( $\alpha$ ) de *Arabidopsis* y el mutante hipomórfico *icu2-1*, presenta un fenotipo floración temprana (Barrero et al., 2007). Por su parte *EARLY IN SHORT DAYS 7 (ESD7)*

codifica la subunidad catalítica de la DNA polimerasa epsilon ( $\epsilon$ ) y también está implicado en la represión de la floración, participando en mecanismos de silenciamiento epigenético de los loci *FT*, *SOC1* y *AG* (del Olmo et al., 2010).

Igualmente, se ha demostrado que la expresión de *SOC1* está regulada a nivel epigenético a través de MSI1, cuya función es independiente de *FLC* (Bouveret et al., 2006). La proteína MSI1 es requerida para el establecimiento H3K4me2 y H3K9Ac en la cromatina de *SOC1*, que corresponde con el aumento de expresión de dicho locus, promoviendo la floración en *Arabidopsis* (Bouveret et al., 2006).

## **5. EL COMPLEJO SWR1 DE ARABIDOPSIS Y SU IMPLICACIÓN EN DIFERENTES ASPECTOS DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS**

El complejo SWR1 pertenece al conjunto de remodeladores de la cromatina dependientes de ATP incluidos en la familia SWI/SNF (Morrison y Shen, 2009). SWR1-C utiliza la energía obtenida de la hidrólisis de ATP para intercambiar dímeros H2A-H2B por otros H2A.Z-H2B en los nucleosomas, de manera que desestabiliza las uniones de los nucleosomas, desplazándolos y permitiendo una conformación más laxa de la cromatina (Krogan et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004). Sin embargo, el papel que juega la variante histónica H2A.Z en la regulación de la expresión génica ha sido ampliamente discutido, ya que se encuentra tanto en zonas de heterocromatina como en zonas transcripcionalmente activas (Draker y Cheung, 2009). La función del SWR1-C está relacionada con diversos procesos que son esenciales para la célula, como la segregación cromosómica durante la mitosis, la regulación de la longitud de los telómeros, la progresión del ciclo celular, la respuesta a los daños producidos en el DNA, la regulación de la transcripción o el establecimiento de la heterocromatina (Morrison y Shen, 2009; Kumar et al., 2010). En todos los organismos eucariotas estudiados se han descrito complejos similares a SWR1-C, como el complejo SRCAP (SWI2/SNF2-related CBP Activator Protein) de humanos o el complejo dTIP60 de *Drosophila* que incluye subunidades homólogas, tanto del SWR1-C como del complejo NuA4 de levaduras (Deal et al., 2007; Morrison y Shen, 2009; Wu et al., 2009b; Billon y Côté, 2011) (Tabla 1).

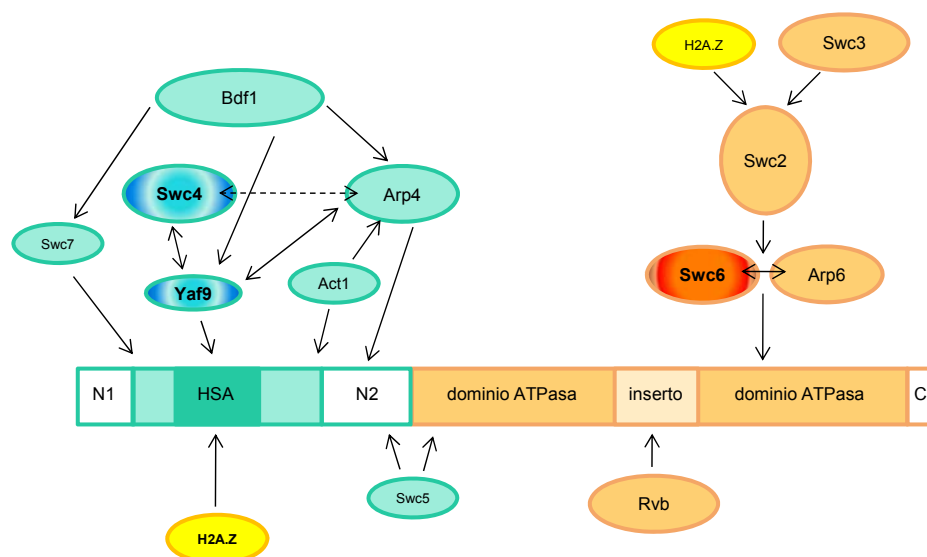
La caracterización del SWR1-C en levaduras ha permitido identificar 14 subunidades (Wu et al., 2009b). Las subunidades Swr1, Swc2, Bdf1, Swc3, Arp6, Swc5, Yaf9, Swc6 y Swc7 están codificadas por genes no esenciales, mientras que las subunidades Rvb1, Rvb2, Arp4, Swc4 y la actina 1 (Act1) son indispensables para la



viabilidad celular (Krogan et al., 2003; Kobor et al., 2004; Mizuguchi et al., 2004; Wu et al., 2009b). Se ha demostrado que la incorporación de H2A.Z *in vivo* depende únicamente de algunas subunidades del complejo como Swr1, Swc2, Arp6, Swc6 y Yaf9 (Krogan et al., 2003; Zhang et al., 2004).

Swr1 corresponde a la subunidad catalítica con función ATPasa y presenta regiones características que determinan la disposición de las demás subunidades en el complejo (Wu et al., 2009b). En la región carboxilo-terminal, la proteína Swr1 presenta un dominio ATPasa donde se unen las subunidades Swc6 y Arp6, que interactúan físicamente entre sí, y son necesarias para la unión de Swc2 (Wu et al., 2009). La subunidad Swc2 juega un papel muy importante en el reclutamiento del SWR1-C y se une directamente a la variante histónica H2A.Z, transfiriéndola a la cromatina (Mizuguchi et al., 2004; Wu et al., 2005, 2009b; Morillo-Huesca et al., 2010). Igualmente, las proteínas Rvb1 y Rvb2 también se encuentran asociadas a la región carboxilo-terminal de la subunidad Swr1 (Wu et al., 2009b). En el extremo amino-terminal de Swr1 se forma un subcomplejo constituido por las subunidades Bdf1, Swc7, Swc4, Yaf9, Arp4 y Act1 (Wu et al., 2009b). La unión de Bdf1 a Swr1 requiere de las proteínas Swc7, Yaf9 y Arp4 (Wu et al., 2009b). La proteína Bdf1 contiene dos bromodominios que le permiten reconocer y unirse a las histonas H3 y H4 acetiladas, y está implicada en la regulación de la transcripción, a través de la interacción con la subunidad TFIID durante la activación de la RNA polimerasa II (Matangkasombut et al., 2000; Ladurner et al., 2003; Matangkasombut y Buratowski, 2003; Durant y Pugh, 2007). El extremo amino-terminal de Swr1 presenta un dominio HSA (helicase-SANT-associated) importante para la asociación de las proteínas Act1 y Arp4 (Doerks et al., 2002; Szerlong et al., 2008; Trotter et al., 2008). Esta última subunidad juega un importante papel estructural en la integridad del SWR1-C, ya que es requerida para la unión de las subunidades Bdf1, Yaf9, Swc4 y en menor medida, Act1, Arp6 y Swc2 (Wu et al., 2009b). Estudios realizados en levaduras han demostrado que la subunidad Swc4 interactúa físicamente con Yaf9 y la asociación de estas subunidades con Arp4 es interdependiente (Wu et al., 2009b). Además, Arp4 presenta la capacidad de interactuar con histonas o nucleosomas directamente, y participa en la incorporación de H2A.Z (Galarneau et al., 2000; Sunada et al., 2005). Por su parte, la proteína Swc4 contiene un dominio SANT (SWI3, ADA2, N-CoR y IFIIB), implicado en la interacción con histonas y/o DNA (Boyer et al., 2004) y la subunidad Yaf9 contiene un dominio YEATS (Yaf9, ENL, AF9, Iaf14, Sas5), implicado en la incorporación de H2A.Z a la cromatina, que también es capaz de unir histonas H3 y H4 *in vitro* (Wang et al., 2009b). El extremo amino-terminal de Swr1 también se une de forma directa y preferente a la

variante H2A.Z, frente a la histona H2A, lo que supone otro punto de reclutamiento de H2A.Z, además del aportado por Swc2. Estos datos sugieren que el SWR1-C puede unirse a dos dímeros H2A.Z-H2B aumentando su eficiencia en la transferencia de esta variante histónica a los nucleosomas (Wu et al., 2009b) (Fig. 5).



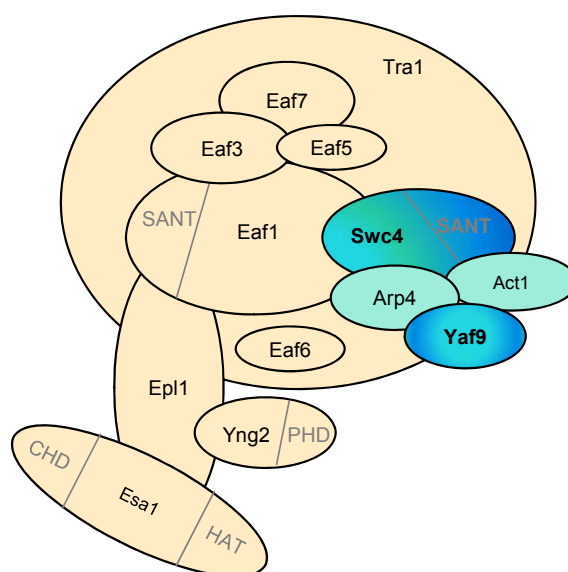
**Fig.5. Esquema representativo de las diferentes subunidades que forman parte del complejo SWR1 en levaduras, indicando las interacciones existentes entre ellas** (Adaptado de Wu et al., 2009b).

Algunas de las subunidades que están presentes en el SWR1-C también forman parte de otros complejos de remodelación de cromatina de levaduras (Morrison y Shen, 2009; Billon y Côté, 2011). Este es el caso de las helicasas Rvb1 y Rvb2, de Act1 y de Arp4, que se encuentran en el complejo INO80 (Shen et al., 2000) y de las subunidades Yaf9, Swc4, Act1 y Arp4, que forman parte del NuA4-C, con actividad acetiltransferasa de histonas (Kobor et al., 2004; Owen-Hughes y Bruno, 2004; Raisner y Madhani, 2006). Se ha propuesto que las subunidades Yaf9, Swc4, Act1 y Arp4 podrían funcionar de forma cooperativa para facilitar la asociación de los complejos SWR1 y NuA4 con la cromatina (Zhou et al., 2010) (Tabla 1).

El NuA4-C identificado en levaduras se compone de 13 subunidades y presenta una subunidad catalítica, denominada Esa1, que es esencial para la viabilidad de estos organismos (Doyon y Côté, 2004). La subunidad Esa1, junto con Epl1 y Yng2, forma un subcomplejo denominado Piccolo NuA4, que es el responsable de la acetilación de las colas de histonas H4, H2A y H2A.Z (Boudreault et al., 2003; Matangkasombut et al., 2003; Doyon y Côté, 2004; Babiarez et al., 2006; Keogh et al., 2006; Millar et al., 2006; Lin et al., 2009) (Fig. 6). Al igual que el SWR1-C, NuA4-C tiene un importante papel en

la regulación de la transcripción, el silenciamiento de la heterocromatina, la progresión del ciclo celular y en la reparación del DNA, y se encuentra muy conservado evolutivamente desde levaduras hasta humanos (Doyon y Côté, 2004; Auger et al., 2008). De hecho, también se ha observado que la subunidad Bdf1 interacciona funcionalmente con Esa1, de manera que la supresión de Bdf1 o la alteración de la acetilación de las histonas, origina defectos en la incorporación de H2A.Z, lo que sugiere la existencia de una relación entre la proteína Bdf1 y el NuA4-C durante el intercambio histónico en la cromatina (Boudreault et al., 2003; Matangkasombut et al., 2003; Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005; Durant y Pugh, 2007; Altaf et al., 2010).

Por su parte, el dTIP60-C de *Drosophila*, que presenta subunidades homólogas a los complejos SWR1 y NuA4 de levaduras, tiene la capacidad de acetilar histonas e intercambiar la histona H2A por la variante H2A.Z en la cromatina, lo que demuestra una conservación funcional como resultado de la fusión de ambos complejos (Doyon et al., 2004; Kusch et al., 2004; Auger et al., 2008) (Tabla 1).



**Fig.6. Representación esquemática de las subunidades del complejo NuA4 de levaduras** (Adaptado de Doyon y Côté, 2004).

En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la función del SWR1-C de levaduras y se ha desvelado que su acción se desarrolla en regiones de heterocromatina para inducir una señal de antisilenciamiento mediante la incorporación de la variante histónica H2A.Z, que implica la acetilación de H4 (Zhou et al., 2010). Asimismo, se ha definido a Swc4 como una subunidad esencial tanto para la acetilación de H4 como para el intercambio de H2A por H2A.Z, regulando la incorporación de

SWR1-C y NuA4-C a la cromatina (Zhou et al., 2010). Tomando todos estos datos, se ha propuesto que SWR1-C y NuA4-C funcionan de una forma sinérgica contribuyendo al establecimiento de una cromatina menos compacta que favorezca la activación transcripcional de los loci donde actúan (Rusche et al., 2003; Zhou et al., 2010).

En *Arabidopsis*, se han identificado posibles genes homólogos para la mayoría de las subunidades que forman parte del complejo SWR1 en levaduras (March-Díaz y Reyes 2009). Este es el caso de *PIE1*, homólogo de la subunidad Swr1 de levaduras (Noh y Amasino, 2003) y del gen *ESD1/ARP6*, éste último caracterizado en nuestro laboratorio como un ortólogo de la subunidad Arp6 (Martín-Trillo et al., 2006; Choi et al., 2007; Deal et al., 2007). Aproximaciones de doble híbrido llevadas a cabo con las subunidades identificadas en *Arabidopsis*, sugieren la existencia de un complejo formado por *PIE1*, *ESD1/ARP6*, *SWC6* y *SWC2*, donde *PIE1* y *SWC2* interactúan con H2A.Z, al igual que ocurre en el complejo SWR1-C de levaduras (Choi et al., 2007; Wu et al., 2009b). Los genes que codifican para *PIE1*, *ESD1/ARP6* y H2A.Z, se expresan ubicuamente en todos los órganos y tejidos analizados, y su expresión es mayor en aquellos tejidos que presentan una alta tasa de proliferación celular (Noh y Amasino, 2003; Choi et al., 2005, 2007; Deal et al., 2005; Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008; March-Díaz y Reyes, 2009). Los mutantes para los genes *PIE1*, *ESD1/ARP6* y para dos de los tres genes que codifican para H2A.Z en *Arabidopsis*, *HTA9* y *HTA11* (March-Díaz et al., 2008), presentan un fenotipo similar, con alteraciones pleiotrópicas tanto en la fase vegetativa como reproductiva, incluyendo defectos en el desarrollo como porte más pequeño, hojas aserradas, pérdida de dominancia apical, y flores con pétalos y sépalos extras, así como una aceleración del tiempo de floración causada por un descenso en la expresión de *FLC* y un aumento de la expresión de *FT* y *SOC1* (Noh y Amasino, 2003; Choi et al., 2005, 2007; Deal et al., 2005, 2007; Martín-Trillo et al., 2006; March-Díaz et al., 2007, 2008; Lázaro et al., 2008). Se ha demostrado que en mutantes *pie1* y *esd1/arp6*, además de un descenso en la expresión de *FLC*, también disminuye la expresión de los genes *MAF4* y *MAF5*, y que en mutantes *hta9 hta11* disminuye la expresión de *MAF4*, aunque la expresión de *MAF5* no sufre cambios significativos (March-Díaz y Reyes, 2009). Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina corroboran que tanto *PIE1* como *ESD1/ARP6* son necesarios para la introducción de H2A.Z en los sitios de iniciación y terminación de la transcripción de los genes *FLC*, *MAF4* y *MAF5* (Deal et al., 2007) y que estas proteínas son necesarias para el mantenimiento de elevados niveles de acetilación de H3 y metilación de H3K4 en la cromatina de *FLC* (Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008).

Por su parte, también se han caracterizado las subunidades homólogas a ARP4 y RVB1 de Arabidopsis, codificadas por genes únicos (Holt et al., 2002; Kandasamy et al., 2005). Las mutaciones en estos genes conducen a un fenotipo de letalidad embrionaria, lo que sugiere un importante papel de estos componentes para la viabilidad de la planta (Holt et al., 2002; Kandasamy et al., 2005). Es interesante observar que el silenciamiento del gen *ARP4* en Arabidopsis mediante RNA interferente (RNAi), confiere un fenotipo similar al de los mutantes *pie1* o *esd1/arp6*, incluyendo una floración acelerada en condiciones de DL, un menor tamaño de la planta, menor número de hojas de roseta, flores más pequeñas y una drástica reducción de la fertilidad (Kandasamy et al., 2005; March-Díaz y Reyes, 2009). Además, la reducción en la expresión del gen *RVB1/TIP49a* origina un aumento de la expresión de genes implicados en varias respuestas de estrés biótico (Holt et al., 2002). Igualmente, se ha observado que en mutantes *pie1*, *swc6* y *hta9 hta11*, se producen lesiones espontáneas indicativas de muerte celular, debidas a una inducción constitutiva de los genes de la respuesta de Resistencia Sistémica Adquirida (SAR; Systemic Acquired Resistance) y una activación de los genes de resistencia a bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas syringae*, en ausencia de infección por estos patógenos (Greenberg y Yao, 2004; March-Díaz et al., 2008). Todos estos datos indican que el SWR1-C está implicado en importantes y diversos procesos biológicos que afectan a distintos aspectos del desarrollo de las plantas, ya que no solo participa en el control del tiempo de floración mediante la activación de *FLC*, *MAF4* y *MAF5* o la regulación de *FT*, sino que también es requerido para el mantenimiento de un estado reprimido de la respuesta SAR en Arabidopsis (March-Díaz y Reyes, 2009).

Recientemente se ha demostrado que la pérdida de función de los tres genes que codifican H2A.Z en Arabidopsis (*HTA8*, *HTA9* y *HTA11*) presenta un fenotipo más extremo que aquellas plantas que solo tienen dos de estos genes silenciados (*HTA9* y *HTA11*), indicando una redundancia funcional entre ellos (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Dicha variante histórica ha sido identificada en la cromatina de los genes *FLC*, *MAF4* y *MAF5* (Deal et al., 2007). La pérdida de la histona H2A.Z en la cromatina de *FLC* está asociada a una reducción de expresión de este gen y a un fenotipo de floración temprana (Deal et al., 2007). Asimismo, la variante H2A.Z participa en la promoción de la expresión de *FT* en respuesta a un aumento de la temperatura ambiental (Kumar y Wigge, 2010). En base a todas estas observaciones se ha propuesto la existencia de un complejo SWR1 en plantas, que cataliza el intercambio de la histona H2A por la variante H2A.Z, promoviendo una desestabilización de la estructura de la cromatina, y es fundamental para la regulación de la expresión

transcripcional de los principales genes reguladores de la floración, en respuesta a ciertos cambios provocados en las condiciones ambientales en las que se desarrollan las plantas (Deal et al., 2007; Kumar y Wigge, 2010; Coleman-Derr y Zilberman, 2012).

Como ya hemos comentado, en el complejo SWR1-C de levaduras, las subunidades Swc6, Yaf9 y Swc4 son necesarias para la incorporación de H2A.Z en la cromatina y en concreto, Swc4 se caracteriza por ser un componente esencial en la acetilación de H4, participando en la regulación de la incorporación de SWR1-C y NuA4-C a la cromatina (Krogan et al., 2003; Zhang et al., 2004; Zhou et al., 2010). Por ello, con el fin de profundizar en la función que el hipotético SWR1-C pudiera tener en plantas, nos hemos propuesto como objetivos en esta Tesis Doctoral la caracterización funcional de las subunidades homólogas de Swc6, Swc4 y Yaf9 en *Arabidopsis*, así como su posible implicación en el control del tiempo de floración y en otros procesos del desarrollo.

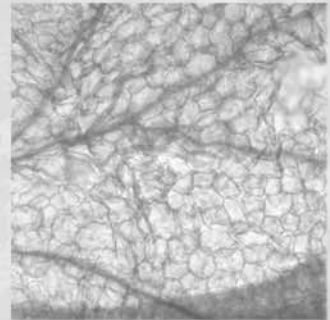
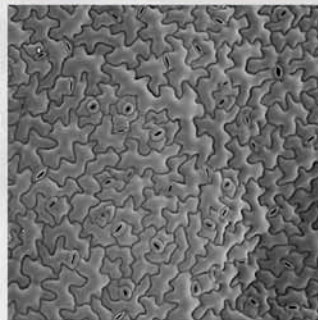
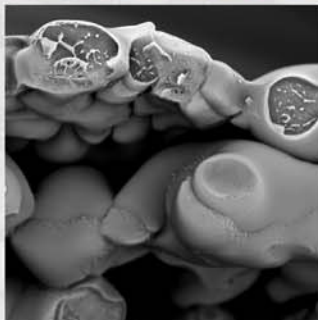
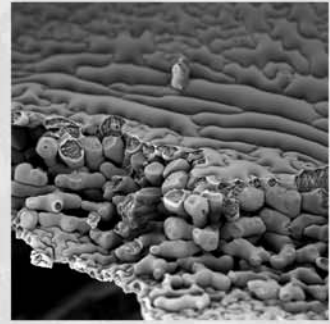
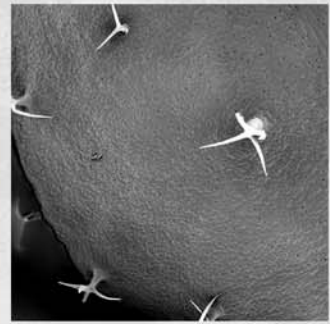
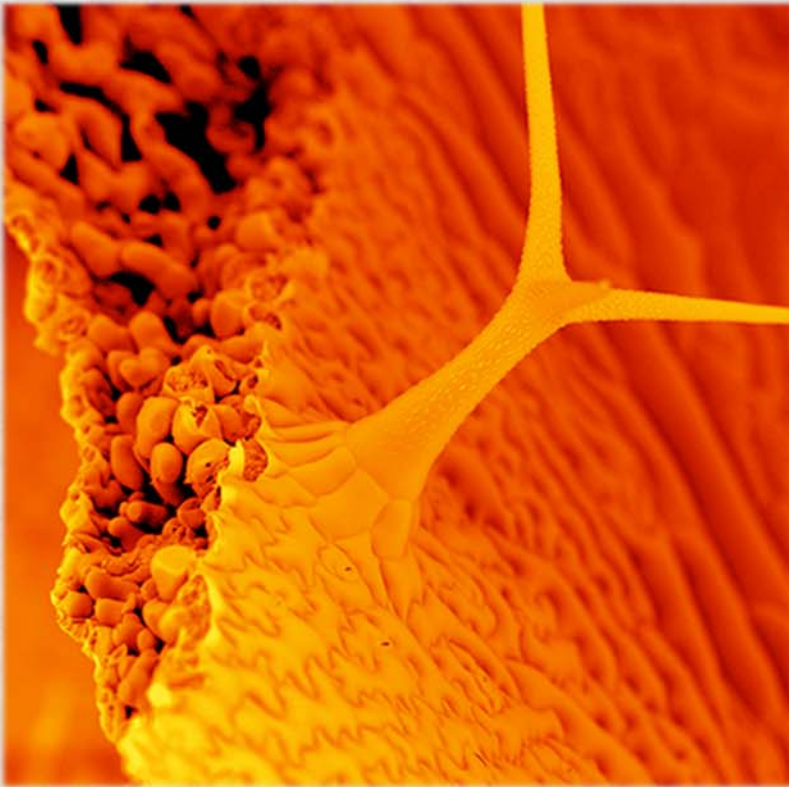
SWR1 <i>S.cerevisiae</i>	NuA4 <i>S.cerevisiae</i>	dTIP60 <i>D.melanogaster</i>	SRCAP <i>H.sapiens</i>	SWR1 <i>A.thaliana</i>	Dominio/función
Swr1	Eaf1	Domino	SRCAP	PIE	SANT/helicasa
Arp4	Arp4	BAP55	BAF53a	ARP4	Relacionada con actina
Arp6			ARP6	ARP6/ESD1	Relacionada con actina
Act1	Act1	Act87B	Actin	ACT1-4, ACT7,8,11,12	
Swc2/Vps72		dYL1	YL1	SWC2	TF
Swc3		-	-	-	
Swc4	Swc4/Eaf2	dDMA	DMAP1	SWC4	SANT/unión DNA
Swc5				SWC5	TF
Swc6/Vps71		-	ZnF-HIT1	SWC6/SEF1	Hit-Zinc finger/unión proteínas
Swc7		-	-	-	
Yaf9	Yaf9	dGAS41	GAS41	YAF9A/YAF9B	YEATS
Rvb1		dPontin	TIP49a	TIP49a/RIN1	Unión a proteínas
Rvb2		dReptin	TIP49b	RVB2A/RVB2B	Helicasa de DNA
Htz1		H2Av	H2A.Z	HTA8/HTA9/HTA11	Unión a ADN
	Esa1	dTip60			Cromodominio/ MYST HAT
	Eaf3	dMrg15			Cromodominio
	Eaf7	dMrg8			
	Epl1	E(Pc)			EPcA
	Tra1	dTra1			PtdIns-3 kinasa/ATM
	Yng2	dIng3			PHD
	Eaf6	dEaf6			
	Eaf5				

**Tabla 1. Proteínas identificadas como subunidades estables de los complejos NuA4, SWR1, dTIP60 y SRCAP de *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* y *Homo sapiens*, respectivamente, y subunidades homólogas en *Arabidopsis thaliana*. (TF; transcription factor); (Tabla adaptada de March-Díaz y Reyes, 2009).**





# OBJETIVOS





## OBJETIVOS

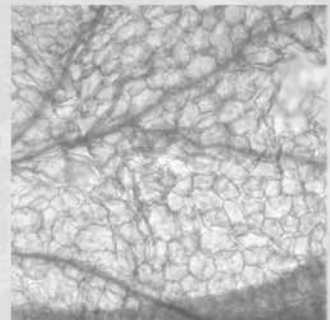
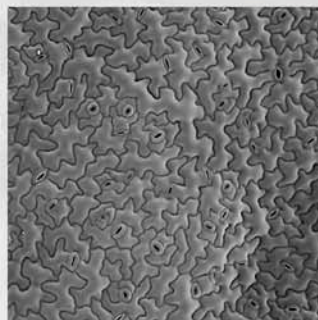
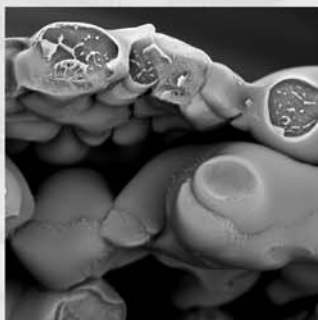
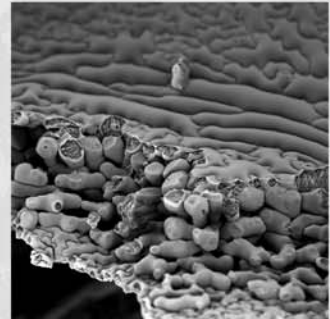
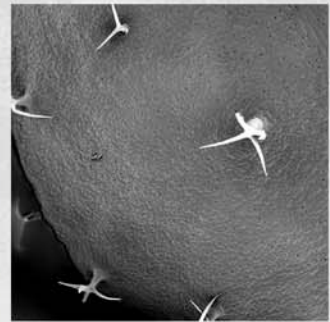
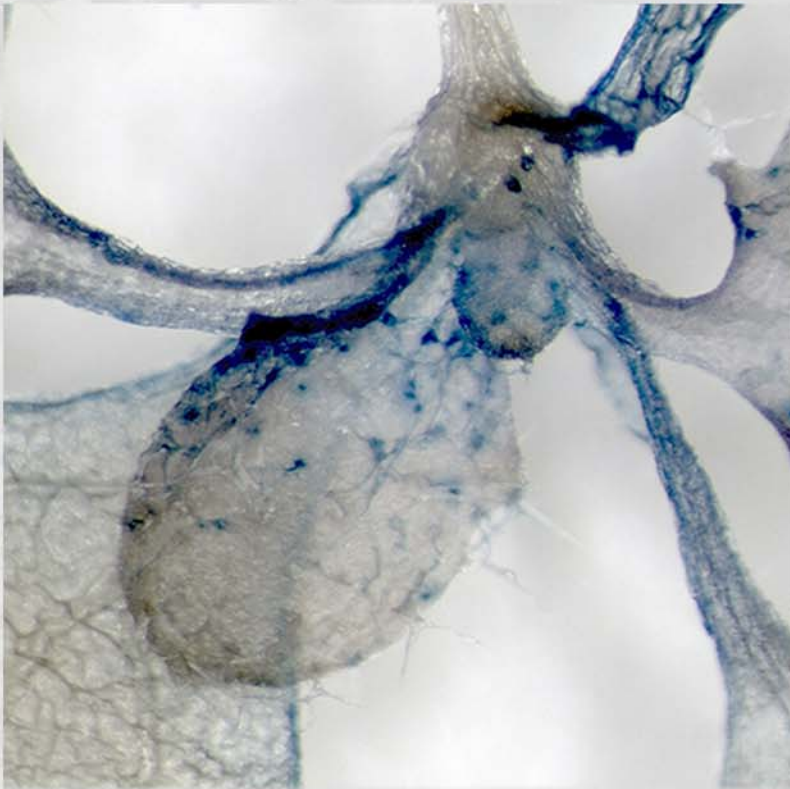
Nuestro grupo de investigación está interesado en profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el tiempo de floración y en particular, en aquellos factores que inhiben el inicio de la floración hasta que la planta se encuentra en las condiciones medioambientales óptimas o alcanza el nivel de desarrollo adecuado para florecer. El aislamiento de mutantes con fenotipo de floración temprana en *Arabidopsis* ha puesto de manifiesto la posible existencia de un complejo remodelador de cromatina SWR1 responsable de la incorporación de la variante histónica H2A.Z en la cromatina de determinados genes de floración, controlando el inicio de la transición floral. Se han caracterizado varias subunidades ortólogas de este complejo en levaduras, cuya ausencia de función confiere alteraciones fenotípicas en caracteres vegetativos y reproductivos, incluyendo una aceleración de la floración.

Con el fin de profundizar en el papel del complejo SWR1 en el control del inicio de la floración y explorar su interdependencia con otros complejos remodeladores de cromatina, como NuA4, con actividad acetiltransferasa de histonas, nos propusimos caracterizar a nivel genético y molecular SWC4, SWC6 y YAF9, ortólogos de tres de las subunidades presentes en SWR1-C de levaduras, y que en el caso de SWC4 y YAF9, también forman parte del complejo NuA4. Para ello, hemos llevado a cabo los siguientes objetivos:

1. Caracterización genética y molecular del gen *SWC6* como represor del tiempo de floración en *Arabidopsis* y análisis de su relación con *ESD1*, gen que codifica la subunidad ARP6 del complejo.
3. Caracterización genética y molecular del gen *SWC4* en *Arabidopsis* y análisis de su funcionalidad en la regulación de diferentes caracteres vegetativos y reproductivos.
4. Caracterización genética y molecular de los genes *YAF9A* y *YAF9B* como reguladores del tiempo de floración y de otros procesos de desarrollo en *Arabidopsis*.
5. Análisis funcional de *SWC4*, *YAF9A* y *YAF9B* de *Arabidopsis*, en relación con su participación en los complejos remodeladores de cromatina, SWR1 y NuA4.



# MATERIALES Y MÉTODOS





## 1. Fondos genéticos y material vegetal

Para la realización del presente trabajo hemos utilizado la cepa silvestre de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Columbia (Col). Asimismo, hemos utilizado las líneas mutantes y las líneas de introgresión que se recogen en la tabla 2. Los stocks de semillas mutantes utilizados se encuentran en fondo genético Col y se obtuvieron del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (Columbus, USA), del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, UK) y de donaciones personales de distintos grupos de investigación.

Línea	Ecotipo	Fenotipo de floración	Referencia
<b><i>esd1-10</i></b>	Col	Floración temprana	Martín-Trillo et al., 2006
<b><i>swc6-1</i></b>	Col	Floración temprana	Lázaro et al., 2008
<b><i>swc6-2</i></b>	Col	Floración temprana	Lázaro et al., 2008
<b><i>fve-3</i></b>	Col	Floración tardía	Ausín et al., 2004
<b><i>flc-3</i></b>	Col	Floración temprana	Michaels y Amasino, 2001
<b><i>sdg8-1</i></b>	Col	Floración temprana	Zhao et al., 2005
<b><i>FRI Sf2</i></b>	Col	Alelo natural de floración tardía introgresado en Col	Lee y Amasino, 1995
<b><i>swc4-1</i></b>	Col	Letal	El presente trabajo
<b><i>swc4-2</i></b>	Col	Similar al fenotipo silvestre	El presente trabajo
<b><i>swc4-3</i></b>	Col	Similar al fenotipo silvestre	El presente trabajo
<b><i>yaf9a-1</i></b>	Col	Ligeramente temprano	El presente trabajo
<b><i>yaf9b-1</i></b>	Col	Similar al fenotipo silvestre	El presente trabajo

**Tabla 2. Líneas mutantes y líneas de introgresión usadas en este trabajo.**

Para la amplificación de determinadas regiones genómicas de los alelos silvestres o para detectar las inserciones de T-DNA en las líneas mutantes, se utilizaron dos cebadores específicos o un cebador específico y un cebador del extremo izquierdo (left border) del T-DNA, respectivamente (Tabla 3). El DNA flanqueante a los extremos de T-DNA fue determinado por la secuenciación de los productos de PCR obtenidos con los cebadores para los extremos de T-DNA y los cebadores específicos del gen.



Alelo	Tipo	Enzima	Directo	Reverso
<i>esd1-10</i>	T-DNA		TGCATGGACTCTCAACCCTAC	CAGCCTGCAGATTTAGGTTTG
<i>swc6-1</i>	T-DNA		AGGACAGGAACATGGAGATTG	AAGTTGTAAAGGCCCAATGG
<i>fve-3</i>	dCAPS	AlwNI	AGAGAGGAAAATGGAGAGCGACG	CTTCTTTTCATTTTAACATCGCTCAGTT
<i>flc-3</i>	INDEL		TAGAAAGAAATAAAGCGAGAAAAGGA	CCCAGGTAAGGAAAAGGCGTA
<i>FRISf2</i>	INDEL		AGATTTGCTGGATTTGATAAGG	ATATTTGATGTGCTCTCC
<i>sdg8</i>	T-DNA		CCTTCATCGCAATCGTAAATC	TTTTGCGCTAAACTAGTTGGG
<i>swc4-1</i>	T-DNA		TTAGCTCTAACGAATCGAACCA	GGACAGCAAAAGTTACTCAATGAC
<i>swc4-2</i>	T-DNA		GCAACAGACCTTCTCATCTGC	CAAGACAGCACAAAGGAGGAAG
<i>swc4-3</i>	T-DNA		GTCTCTGACGTCGTAGGATGC	GCAACAGACCTTCTCATCTGC
<i>yaf9a-1</i>	T-DNA		ACTGGAACAGAGGAGAGAGCC	GCCCGACTAGAGTTATCGAGG
<i>yaf9b-1</i>	T-DNA		CTTTGTATAGCCGATGGAGGC	CCAGGTGCATTCTTGTCTG

Tabla 3. Marcadores moleculares de los alelos mutantes utilizados en este trabajo.

## 2. Condiciones de crecimiento de las plantas

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron bien en sustrato universal y vermiculita (proporción 3:1), o bien en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) en placa Petri para cultivo *in vitro*. Las semillas se esterilizaron previamente durante diez minutos en una solución con 60% de lejía comercial, 0.1% de Tritón X-100 y se aclararon hasta tres veces con agua estéril.

En el caso de cultivo en sustrato universal, las condiciones ambientales controladas fueron constantes, en cámaras a 22°C y 65% de humedad relativa. Las plantas se iluminaron con luz blanca fría fluorescente ( $\sim 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). En cuanto al fotoperiodo, se usaron condiciones de día largo (DL, 16h luz/8h oscuridad) y de día corto (DC, 8h luz/16h oscuridad).

En cultivo *in vitro*, las semillas se sembraron en placas Petri con medio MS suplementado con sacarosa al 2% y agar al 0.8% (medio GM) o agar al 1%, en el caso de crecimiento vertical. Una vez esterilizadas y sembradas, las semillas se estratificaron durante tres días a 4°C, en oscuridad, tras lo cual, se transfirieron a cámaras de cultivo



con las siguientes condiciones: 22°C de temperatura, 65% de humedad relativa e iluminación con luz fluorescente blanca, fría. Para la selección de líneas transgénicas, una vez esterilizadas las semillas de la generación T1, se sembraron a una densidad de 50 semillas/cm<sup>2</sup>, en medio GM suplementado con el antibiótico correspondiente (Kanamicina 50 µg/ml; Higromicina 40 µg/ml; Espectinomomicina 50 µg/ml y Sulfadiazina 75 µg/ml). Una vez obtenidas las semillas de la generación T2, se sembraron en las mismas condiciones, 200 semillas de cada línea T2 de forma independiente y se seleccionaron líneas transgénicas atendiendo a la tasa de supervivencia en un medio selectivo. La proporción 3:1 se tomó como indicativa de aquellas líneas portadoras de una única inserción de T-DNA.

Para el análisis transcripcional mediante PCR cuantitativa (qPCR), RT-PCR semicuantitativa o northern blot, las semillas fueron esterilizadas de igual forma que la descrita anteriormente y sembradas a una densidad de 25 semillas/cm<sup>2</sup>, en placa Petri con medio MS suplementado con agar 0.8%. A continuación, las semillas fueron estratificadas y cultivadas como se ha descrito.

Las células de Arabidopsis de la línea MM2d (Fujiyama et al., 2002) empleadas para la obtención de extractos enriquecidos en histonas, se cultivaron en oscuridad a 26°C en medio MSS, pH 5.8, que está compuesto por un medio MS suplementado con sacarosa al 3%, vitaminas, 0.5 mg/L de ácido naftalenacético (NAA) disuelto en 0.1N de NaOH, y 0.1mg/L de kinetina disuelto en 0.1N de NaOH. Para mantener el cultivo, una fracción de las células se refrescó semanalmente diluyéndolas 1/20 en 50 ml de medio MSS suplementado. Posteriormente, el material vegetal fue recogido en N<sub>2</sub> líquido para su procesamiento y/o análisis dependiendo del experimento.

### **3. Análisis fenotípico**

#### **3.1. Medida del tiempo de floración**

El tiempo de floración está directamente relacionado con el número de hojas predeterminadas en el momento de la aparición del botón floral (Koornneef et al., 1991). De acuerdo con esta premisa, se contabilizó el número total de hojas excepto los cotiledones, es decir, las hojas de la roseta y las hojas caulinares de la inflorescencia principal. Otra manera de medir el tiempo de floración, es mediante la cuantificación del número de días transcurridos desde la siembra hasta la elongación de 1 mm de longitud del primer tallo floral (Pouteau y Albertini, 2009). Los datos se presentan como la media

de los valores obtenidos  $\pm$  la desviación estándar. El tamaño de la muestra fue al menos de 20 plantas en condiciones de DC y de 30 a 50 plantas en DL. Todos los experimentos de cuantificación del tiempo de floración se repitieron al menos tres veces.

### **3.2. Medida de las fases del desarrollo vegetativo**

Las semillas se sembraron en sustrato y vermiculita en condiciones de DL y DC. Cuando la altura de la planta fue de 5 cm, se contó por separado el número de hojas juveniles, que sólo poseen tricomas en su cara adaxial o superior, el número de hojas adultas, que poseen tricomas en ambas caras y el número de hojas caulinares, que pierden casi completamente los tricomas en la cara adaxial (Telfer et al., 1997). El tamaño de la muestra fue de entre 20 y 50 plantas.

### **3.3. Análisis de caracteres morfológicos**

Las semillas se sembraron en sustrato y vermiculita tanto en condiciones de DL como de DC y se midió el diámetro de la roseta, el tamaño de las silicuas y de las flores totalmente desarrolladas. El tamaño de muestra fue de 15 plantas y de 50 silicuas o flores en su caso, obtenidas de cuatro plantas independientes. Asimismo, se contabilizó el número de sépalos y pétalos de flores de 20 plantas cultivadas en condiciones de DC.

### **3.4. Medida del crecimiento de la raíz principal**

Para estimar el crecimiento de la raíz principal se analizaron plántulas cultivadas en cámaras de cultivo *in vitro*, en placas Petri en posición vertical con medio MS en agar al 1%. Las mediciones de la raíz principal se hicieron a los 15 y 18 días después de la germinación. Los experimentos fueron repetidos tres veces y el tamaño de la muestra osciló entre 30 y 40 plántulas.

### **3.5. Cuantificación del número de células**

El análisis del número de células se realizó mediante el recuento de las células epidérmicas, de la tercera y cuarta hoja de la roseta. Para ello, las plantas fueron cultivadas en sustrato y vermiculita, en condiciones de DC. Para las preparaciones de microscopía óptica, las hojas fueron cortadas y fijadas por incubación a 90°C durante 5 minutos, en etanol 90% y durante toda la noche a temperatura ambiente, en una solución de lactofenol (25% (p/v) de fenol, 25% de ácido láctico, 25% de glicerol y 25%

de agua). Cuando las hojas perdieron toda la pigmentación, se montaron en un portaobjetos orientando la cara abaxial hacia arriba y se observaron las células al microscopio óptico. El recuento de células se estableció conforme al recuento del número de células por campo, a 400 aumentos (Tsukaya, 2002). Para los análisis SEM, las plantas fueron cultivadas de forma similar, congeladas en N<sub>2</sub> líquido, sombreadas con una mezcla de Au/Pd coloidal e introducidas en el equipo para la observación de las muestras a baja temperatura (LTSEM), unido a un microscopio electrónico de barrido Zeiss 960 con un detector de electrones (BSE). En ambos tipos de microscopías se contaron las células de tres campos diferentes y de tres hojas independientes, pertenecientes a la 3ª y 4ª hoja de la roseta de cada una de las plantas seleccionadas. Para los análisis de las imágenes obtenidas se utilizó el software ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), para cuantificar la superficie celular de todo el campo de visión de tres zonas diferentes de cada hoja.

### **3.6. Montaje de preparaciones de anteras para microscopía de fluorescencia**

Las anteras fueron recogidas e incubadas toda la noche sobre un portaobjetos, a 4°C en un tampón de coloración, conteniendo igual volumen de tampón de extracción (0.1% Nonidet P-40, 10% dimetil sulfóxido, 5 mM EGTA pH 7.5, 50 mM PIPES pH 6.9) y solución DAPI (1mg ml<sup>-1</sup> DAPI dimetil sulfóxido).

### **3.7. Tinción de Alexander**

Para comprobar la viabilidad del polen, se realizaron preparaciones en un portaobjetos, con el polen maduro de las anteras y añadiendo una gota de la solución de Alexander (10 ml de etanol 95%, 1 ml de verde malaquita 1% en etanol 95%, 25 ml de Glicerol, 5 ml de ácido fucsínico 1% en H<sub>2</sub>O destilada, 0.5 ml de naranja G 1%, 2 ml de ácido acético glacial, 5 g de fenol, 5 g de clorhidrato y 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada). A continuación se visualizó en el microscopio óptico. El citoplasma del polen viable se tiñe de rojo mientras que el polen abortado, no viable, se observa de color verde.

### **3.8. Extracción y cuantificación de clorofilas**

A partir del cultivo *in vitro* en placas de GM, recogimos 100 mg de tejido fresco de plántulas silvestres, *swc6-1*, *swc4i* y del doble mutante *yaf9a yaf9b* cultivadas durante 10 días, en tubos eppendorf conteniendo bolas de vidrio de 1 mm de diámetro, que posteriormente agitamos en un molino SILAMAT (Schaan, Principality of Liechtenstein)

durante 5 segundos (s), con el fin de pulverizar la muestra. Posteriormente, añadimos 1 ml de acetona al 80% y se incubó toda la noche a 4°C. Finalmente, medimos la absorbancia de las muestras a 646,6nm y 663,6nm y calculamos la concentración total de clorofilas por ml, según la fórmula indicada en los trabajos realizados por Moran y Porath (1980):

$$\text{Total Chl } (\mu\text{g/ml}) = 17,76 (A_{646,6}) + 7,34 (A_{663,6})$$

#### **4. Ensayos de Citometría de flujo**

Para este ensayo se seleccionó la tercera y cuarta hoja de las plantas cultivadas en sustrato universal con vermiculita (3:1), tanto en condiciones de DL como en DC, durante 32 días, y se eliminó el nervio principal. A continuación, se cortaron en pequeños trozos sumergidos en 600  $\mu\text{l}$  de tampón Galbraith suplementado con 0.1% Triton X-100 (Galbraith et al., 1991). El producto resultante se pasó a través de un filtro de *nylon* de 48  $\mu\text{m}$  y se tiñeron los núcleos aislados con 50  $\mu\text{g/ml}$  de yoduro de propidio (Sigma) durante 45 minutos. El análisis se realizó con un citómetro de flujo, FACSCalibur (BD Biosciences). De la misma forma se procesaron los cotiledones de plantas cultivadas en placas con medio GM en condiciones *in vitro*, durante 20 días.

#### **5. Análisis genéticos**

##### **5.1. Métodos de manipulación y análisis de DNA genómico vegetal**

Para el genotipado de plantas de *Arabidopsis*, se obtuvo DNA genómico de aproximadamente una hoja de material fresco, que fue procesada en tubo eppendorf conteniendo bolas de vidrio de 1 mm de diámetro y congelado en  $\text{N}_2$  líquido. Posteriormente los tubos fueron sometidos a agitación en un molino SILAMAT 5 s, con el fin de pulverizar la muestra. El DNA genómico se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Bernatzky y Tanksley (1986).

La determinación de las concentraciones de las soluciones de DNA, se realizó en geles de agarosa 0.8% en TBE (p/v) mediante la comparación con muestras de concentración conocida o bien determinando la absorción a 260nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA). Las digestiones con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo por los métodos usuales (Sambrook et al., 1989), siguiendo en cada caso las recomendaciones del fabricante. La electroforesis de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable entre 0.8 y 4% en

TBE (p/v), dependiendo del tamaño esperado de los fragmentos a resolver. El patrón de bandas se visualizó con el sistema de documentación de geles, “*Gel-Doc*” (BIORAD).

## 6. Obtención de líneas de dobles mutantes

Las plantas dobles mutantes analizadas en este trabajo se obtuvieron mediante el cruzamiento de mutantes simples y posterior selección de la doble mutación en la generación F<sub>2</sub>, usando marcadores moleculares asociados a cada mutación (Tabla 3). Para confirmar que las plantas seleccionadas eran dobles mutantes, se comprobó que en la generación F<sub>3</sub> no se producía segregación de los parentales.

## 7. Obtención de construcciones plasmídicas

### 7.1. Análisis de los promotores de *SWC6*, *SWC4* y *YAF9A* en plantas transgénicas

Los cebadores utilizados para amplificar el promotor de *SWC6* (0.4Kb), *SWC4* (0.9Kb) y de *YAF9A* (1Kb) a partir del cDNA correspondiente, se describen en la tabla 4.

Línea Transgénica	Ecotipo	Cebadores
<b><i>SWC6p::GUS</i></b>	Col	SWC6p F: CCCGGGG <b>GTCGAC</b> TTATCTCCTTGGTCTCACTCTCAT SWC6p R: CCCCC <b>GGATCC</b> ATCCCGAAAATGTTTAGATT
<b><i>SWC4p::GUS</i></b>	Col	SWC4p F: CCC <b>GTCGAC</b> GTGTCTCTGACGTCGTAGGATGCTT SWC4p R: CCC <b>GGATCC</b> ATTGTTAATTAGGGTTCTGAATTT
<b><i>YAF9Ap::GUS</i></b>	Col	YAF9Ap F: CCCGGGG <b>GTCGAC</b> TGACGCTCCACTCTAACCCCT YAF9Ap R: CCCCC <b>GGATCC</b> ATTCTTTCTGGGAATTTTA

**Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de los promotores de *SWC6*, *SWC4* y *YAF9A*.** En negrita se señalan los sitios de restricción de las enzimas Sall (G/TCGAC) y BamHI (G/GATCC).

Estos cebadores poseen dianas de restricción diseñadas para poder clonar el fragmento resultante de la amplificación de PCR en un vector pGEMT easy (Promega). Una vez comprobado mediante secuenciación, que el fragmento amplificado no contenía errores, se transfirió al vector pBI101.1, de forma que los promotores quedaron fusionados transcripcionalmente con el gen delator *GUS* contenido en este vector. El vector pBI101.1 es un vector binario que posee un origen de replicación para *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* y se usa para la generación de plantas transgénicas. Las cepas bacterianas se cultivaron en medio LB en presencia del

correspondiente agente selectivo (Sambrook et al., 1989). Los cultivos de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, se mantuvieron en agitación durante 14-16h a 37°C mientras que *A. tumefaciens*, AGL0 (C58C1), se cultivó a 28°C, durante 48h. Para la preparación de células competentes de *E. coli* se utilizó el kit comercial “Z-Competent *E. coli* transformation buffer set” (Zymo Research) y la transformación se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células electrocompetentes de *A. tumefaciens* AGL0, se prepararon según Mersereau et al., 1990 y las transformaciones se llevaron a cabo según Höfgen y Willmitzer (1998), mediante electroporación utilizando el equipo Ventura Mix2. La obtención del DNA bacteriano se realizó siguiendo el protocolo estándar (Sambrook et al., 1989).

## 7.2. Clonación de los cDNAs que codifican las proteínas completas y/o fragmentos de estos cDNAs para SWC6, SWC4, YAF9A y YAF9B

El cDNA completo de SWC6, SWC4, YAF9A y YAF9B, así como el cDNA correspondiente a los fragmentos de diferentes tamaños de SWC4 y YAF9A, se clonaron en los distintos vectores de expresión de proteínas que se indican en la tabla 5, mediante el sistema Gateway (Invitrogen), utilizando los cebadores que se indican en la tabla 6.

VECTORES	
pROK2	Baulcombe et al., 1986
pDNR221	INVITROGEN
pDNR207	INVITROGEN
pGWB5	Nakagawa et al, 2007
pGWB6	Nakagawa et al, 2007
pGWB18	Nakagawa et al, 2007
pGBT8	CLONTECH
pGAD	BIOTECH
pDEST22	INVITROGEN
pDEST32	INVITROGEN
pGEX2TK	INVITROGEN

Tabla 5. Algunos vectores de expresión utilizados para la clonación de las secuencias de SWC6, SWC4, YAF9A y YAF9B.

El producto resultante de la reacción de PCR se empleó como molde para una segunda reacción de PCR con los cebadores del sistema Gateway attB1 y attB2, indicados en la tabla 7. Posteriormente y mediante una reacción de recombinación, BP con el enzima BP clonasa I (Invitrogen), se clonaron en el vector pDONOR 221 o pDONOR 207 y mediante una reacción de recombinación, LR con el enzima clonasa LR I (Invitrogen), se movilizaron los cDNAs completos o fragmentados, a diferentes los vectores de expresión, compatibles con el sistema Gateway (Tabla 5).

cDNA	Cebadores
<b>SWC6</b>	SWC6 GW F: GGAGATAGAACCATGGAGGAAGAGATGTCG SWC6 GW R: CAAGAAAGCTGGGTCTGCAACAAATTTCTGACAA
<b>SWC4</b>	SWC4 GW F: GGAGATAGAACCATGGGCGGTACGGAC SWC4 GW R: CAAGAAAGCTGGGTCTGAGATCAGAGGCTTTCAACT
<b>SWC4</b> <b>Fragmento 1</b>	SWC4-1 F: GGAGATAGAACCATGGGCGGTACGGAC SWC4-1 R: CAAGAAAGCTGGGTCTGCTGGAGACTGAGC
<b>SWC4</b> <b>Fragmento 2</b>	SWC4-2 F: GGAGATAGAACC GCAAACCATCCTCTCATG SWC4-2 R: CAAGAAAGCTGGGTCTGAGATCAGAGGCTTTCAACT
<b>SWC4</b> <b>Fragmento 3</b>	SWC4-3 F: GGAGATAGAACCAGAAAAGAAATATTAACACTACTG SWC4-3 R: CAAGAAAGCTGGGTCTGAGATCAGAGGCTTTCAACT
<b>YAF9A</b>	Y9A GW F: GGAGATAGAACCATGACGAACAGCTCGTCAT Y9A GW R: CAAGAAAGCTGGGTCCAGGTCTGATCCTGTTTTAAC
<b>YAF9A</b> <b>Fragmento 1</b>	Y9A-1 F: GGAGATAGAACCATGACGAACAGCTCGTCAT Y9A-1 R: CAAGAAAGCTGGGTCCAGGACCTGATTCATCTTC
<b>YAF9A</b> <b>Fragmento 2</b>	Y9A-2 F: GGAGATAGAACC GAAGATGAATCAGGTCT Y9A-2 R: CAAGAAAGCTGGGTCCAGGTCTGATCCTGTTTTAAC
<b>YAF9A</b> <b>Fragmento 3</b>	Y9A-3 F: GGAGATAGAACC GTTACAACCTTGCCTGCTCCTATG Y9A-3 R: CAAGAAAGCTGGGTCCAGGTCTGATCCTGTTTTAAC
<b>YAF9B</b>	YAF9B F: GGAGATAGAACCATGGAGTCGGATATCGAGATTTTGTCTG YAF9B R: CAAGAAAGCTGGGTCTGCAACAAGAATGCACCTGGAGGAGGC

Tabla 6. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA de las secuencias de **SWC6**, **SWC4**, **YAF9A** y **YAF9B**.

Para la purificación de los fragmentos de DNA que se utilizarían para la clonación, se realizó una separación electroforética de las bandas y se cortaron del gel. La purificación del gel, del correspondiente fragmento de DNA, se realizó en columnas de separación (QIAquick GEL Extraction kit QIAGEN, Alemania; GeneClean Q-BIOgene, MP Biomedicals USA) y fue secuenciado por el servicio de secuenciación de la “Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid” de la UCM o por el Servicio de

secuenciación de Secugen, S.L. Las secuencias así obtenidas, se analizaron con los programas informáticos Chromas 1.45, GENE RUNNER 3.02 y en los programas de comparación de secuencias (Blast 2 sequences) de la página Web del NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) y de la página web [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org).

Cebadores universales GATEWAY	
<b>attB1:</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTGAAGGAGATAGAACCATG
<b>attB2:</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC

**Tabla 7. Cebadores universales utilizados por el sistema Gateway para la amplificación de los sitios de recombinación.**

## 8. Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas transgénicas fueron generadas siguiendo el método de transformación por de inmersión floral, utilizando la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*. Las plantas transformantes fueron seleccionadas en medio GM con el correspondiente antibiótico. Los niveles de sobreexpresión de los genes fueron estudiados, bien mediante northern blot, usando sondas marcadas radiactivamente específicas para cada uno de ellos, bien mediante RT-PCR, usando como control de carga la expresión del gen *UBQ10* o bien mediante qPCR, usando como control de carga la expresión del gen  $\beta$ -*ACT1*.

Estas plantas se transformaron con la secuencia completa del cDNA de *SWC6*, *SWC4*, *YAF9A*, fusionada a distintos epítomos, según el vector usado, y bajo el control del promotor del gen *35S* del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Assaad y Signer, 1990). También se transformaron plantas transgénicas con el promotor de los genes *SWC6*, *SWC4* y *YAF9A* por encima del ATG, fusionados al gen *GUS*, o con una construcción de RNA interferente (RNAi), formado por un fragmento de aproximadamente 400pb de la región codificante del gen *SWC4* en secuencias repetidas e invertidas, separadas por un intrón.



## 9. Métodos histoquímicos

### 9.1. Ensayos histoquímicos de la actividad $\beta$ -glucuronidasa

La actividad del gen *GUS*, que codifica para  $\beta$ -glucuronidasa, se reveló en plantas transgénicas *pSWC6::GUS* y *pYAF9A::GUS* mediante la incubación en 100mM de  $\text{NaPO}_4$  (pH 7.2), 2.5mM 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucoronidasa, 0.5mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0.5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  y 0.25% de Triton X-100. Incubamos el tejido a 37°C, durante toda la noche. Después de la tinción, la clorofila fue retirada por deshidratación con etanol 70%. En plantas transgénicas transformadas con la construcción *pSWC4::GUS* no se obtuvo ningún resultado de la expresión del gen *GUS*.

## 10. Análisis de Expresión

### 10.1. Extracción de RNA

Para la extracción de RNA total se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen-Gibco) o se utilizaron kits de extracción de RNA con columnas microspin (RNAqueous, Ambion, Applied Biosystems USA; Rneasy Mini Kit QUIAGEN, Alemania; EZNA Plant RNA Kit, Omega Bio-tek, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante, a partir de material vegetal congelado y pulverizado en mortero con  $\text{N}_2$  líquido de forma similar a como se ha detallado en el caso del DNA. Seguidamente, se realizó un tratamiento con DNasa libre de RNasa, en columna, durante 15 minutos a 25°C, para eliminar cualquier rastro de DNA genómico. La concentración de RNA total se cuantificó por espectrofotometría (Sambrook et al., 1989) en NanoDrop ND-1000 (Termo Scientific, USA).

### 10.2. Análisis de la expresión del RNA mensajero

La cuantificación por northern blot del RNA mensajero (mRNA) de genes específicos se realizó a partir de 10  $\mu\text{g}$  del RNA total y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1%, en presencia de formaldehído/formamida (Sambrook et al., 1989), lo que permitió comprobar la integridad de las muestras de RNA empleadas. El tampón utilizado como electrolito fue MOPS 1X (Sambrook et al., 1989). Las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 65°C antes de cargarse en el gel de agarosa, diluidas en un tampón de carga compuesto por MOPS 10X, formaldehído, formamida y bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989). El RNA total se transfirió a membranas Hybond-N+ (Amersham-Pharmacia) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En aproximaciones de RT-PCR semicuantitativa, para la síntesis de cDNA total se utilizó el kit "Super-Script<sup>TM</sup> First-Strand synthesis for RT-PCR" (Invitrogen, California USA) usando aproximadamente entre 3 y 5 $\mu\text{g}$  de RNA total. El cDNA resultante se diluyó 1:10 y se tomaron 2 $\mu\text{l}$  para cada reacción de PCR, en 20 $\mu\text{l}$  de

volumen final. Las condiciones de amplificación se ajustaron en cada caso, tal y como se indica en la tabla 8, con el fin de no saturar el resultado de la reacción. Como control de carga se realizó en cada caso una reacción de PCR con cebadores que nos permitían amplificar un fragmento de cDNA del gen de *UBQ10*. Los fragmentos de DNA obtenidos tras la amplificación, se separaron en electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a membranas Hybond-N+ (Amersham-Pharmacia) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la preparación de cDNA de plantas Col, se realizó transcripción reversa del RNA total de plántulas completas, raíces, hojas caulinares y de roseta, tallo principal, yemas florales y flores, según se describe en Martín-Trillo et al., 2006. Los niveles de transcrito de *SWC6* fueron ensayados por RT-PCR con los cebadores específicos 5'ATGGAGGAAGAGATGTCTGAACC3' y 5'CGAGATCATCATCTTCATCAAGA3', diseñados para amplificar la región codificante del extremo amino-terminal. En el caso de *SWC4* los cebadores específicos para la región codificante son 5'CAGCAGATGTTGCCAAACCATCCTCT3' y 5'GGGTAGAGGCATAATCTGCCATAGT3'. Para *YAF9A* los cebadores utilizados fueron 5'ACTGGAACAGAGGAGAGAGCC3' y 5'GCCCCACTAGAGTTATCGAGG3' que nos permiten discernir de la expresión de *YAF9B* en cuyo caso usamos los cebadores 5'ATGGAGTCCGATATCGAGATTTTGT3' y 5'GTAGCTCCACGTACATAAACAGTCC3'. Para el resto de genes analizados, como *FLC*, otros miembros de la familia *MAF* (*MAF1-MAF5*), *FT* y *SOC1*, se realizaron RT-PCRs según se describe en la tabla 8 (Scortecci et al., 2001; Piñeiro et al., 2003; Ratcliffe et al., 2003; Martín-Trillo et al., 2006). Se utilizó la expresión del gen *UBQ10* como control de carga en estos experimentos (Tabla 8).

Los ensayo de qPCR se llevaron a cabo con el kit "Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I" según el protocolo descrito por Roche, usando 2µl de muestra de cDNA obtenida según lo descrito en la sección 10.2. Los oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión mediante qPCR se describen en la tabla 9. Los niveles de expresión relativa fueron normalizados mediante la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -*ACTIN1* (*ACT1*) (Chiang et al., 2009; Morris et al., 2010) (Tabla 9).

Sonda	Programa	Directo	Reverso
<b>UBQ10</b>	94°(2')[94°(1')67°(1')72°(30'')]x20 72°(5') 4°(∞)	GATCTTTGCCGGAAAACAATTGGAGGATGGT	CGACTTGTTCATTAGAAAAGAAAGAGATAACACG
<b>FLC</b>	94°(5')[94°(30'') 65°(30'')72°(1'')]x25 72°(5') 4°(∞)	TTAGTATCTCCGGCGACTTGAACCCAAACC	AGATTCTCAACAAGCTTCAACATGAGTTCCG
<b>FT</b>	94°(5')[94°(1')65°(1')72°(35'')]x32 72°(1') 4°(∞)	ACAACCTGGAACAACCTTTGGCAATG	ACTATAGGCATCATCACGGTTCGTTACTGG
<b>SOC1</b>	94°(5')[94°(30'')8°(30'')72°(30'')]x25 72°(7') 4°(∞)	GGCATACTAAGGATCGAGTCAGCACCAAAC	ACCCAATGAACAATTGCGTCTCTACTTCAG
<b>MAF1</b>	94°(5')[94°(30'')65°(30'')72°(1'')]x30 72°(5') 4°(∞)	ATGGTCTCATCGACAAAGCTCGAC	CTCTTAATTATGAATCAGGCTTTGAG
<b>MAF2</b>	94°(5')[94°(30'')69°(30'')72°(1'')]x28 72°(5') 4°(∞)	GGGTAGAAAAAAGTCGAGATCAAGCGA	CTTGAGCAGCGGAAGAGTCTCC
<b>MAF3</b>	94°(5')[94°(30'') 65°(30'')72°(1'')]x35 72°(5') 4°(∞)	GAAGAAAAAAGCAAACACATTTTGGGTCC	AAGAACTCTGATATTTGTCTACTAAGGTAC
<b>MAF4</b>	94°(5')[94°(30'') 69°(30'')72°(1'')]x35 72°(5') 4°(∞)	ATTAGGTCAGAAGAATTAGTCGGAGAAAC	CTTGATGACTTTTCCGTAGCAGGGGGAAG
<b>MAF5</b>	94°(5')[94°(30'') 69°(30'')72°(1'')]x35 72°(5') 4°(∞)	GGGGATTAGATGTGTCGGAAGAGTGAAG	GATCCTGTCTTCCAAGGTAACACAAAGG
<b>SWC6</b>	94°(5')[94°(30'') 60°(30'')72°(30'')]x30 72°(5') 4°(∞)	ATGGAGGAAGAGATGTGCAACC	CGAGATCATCATCTTCATCAAGA
<b>SWC4</b>	94°(5')[94°(30'') 60°(30'')72°(30'')]x30 72°(5') 4°(∞)	CAGCAGATGTTGCAAACCATCCTCT	GGGTAGAGGCATAATCTGCCATAGT
<b>YAF9A</b>	94°(5')[94°(30'') 69°(30'')72°(30'')]x30 72°(5') 4°(∞)	ATGACGAACAGCTCGTCATCGAAG	GAGCAGGCAAGTTGTAACCAGAGG
<b>YAF9B</b>	94°(5')[94°(30'') 65°(30'')72°(30'')]x30 72°(5') 4°(∞)	ATGGAGTCGGATATCGAGATTTTGT	GTAGCTCCACGTACATAAACAGTCC

Tabla 8. Programas de PCR y cebadores utilizados en los análisis de expresión de cada uno de los genes descritos.

LOCUS	GEN	DIRECTO	REVERSO
At3g18780	ACT1	TGTCGCCATCCAAGCTGTTCTCT	GTGAGACACCATCACCAGAAT
At5g37055	SWC6	ATGGAGGAAGAGATGTCGAACC	CGAGATCATCATCTTCATCAAGA
At2g47210	SWC4	CAGCAGATGTTGCAAACCATCCTCT	GGGTAGAGGCATAATCTGCCATAGT
At5g45600	YAF9A	ATGACGAACAGCTCGTCATCGAAG	GAGCAGGCAAGTTGTAACCAGAGG
At2g18000	YAF9B	ATGGAGTCGGATATCGAGATTTTGT	GTAGCTCCACGTACATAAACAGTCC
At2g45660	SOC1	GCCTTTGAGCTCTCAGTGCTTTG	CTTCGCTTTCATGAGATCCCCAC
At1g65480	FT	CTTGGCAGGCAAACAGTGTATGCAC	GCCACTCTCCCTCTGACAATTGTAGA
At5g10140	FLC	CCGAACTCATGTTGAAGCTTGTGAG	CGGAGATTTGTCCAGCAGGTG
At5g15840	CO	GAGAAATCGAAGCCCGAGGAGCA	TCAGAATGAAGGAACAATCCCATA
At1g08560	KNOLLE	GAAGCTGGAAGATGGATAA	ACAGCCATATCAAGAAACACT
At1g16970	KU70	TGTCAGTTTATCTATTGGCTCA	TCCGCGTGATGGCAGTGATAGC
At2g26760	CYC B1,4	CAGGAAAGGATGTTGCGAAGA	AATCCCTCCTTCTCTTCCAC
At4g21070	BRCA1	GTGACGAGCATAAACCCCTGATT	ATGAAATGAGAATACGAAGAAA
At5g59690	H4	TTCTGAGAGACAACATCCAAGGA	AAGAGTCCTTCTTGCCTCTT
At1g21910	TINY	GTGTCCGAAAGAGGAACTGG	TATAGCGGAGGCTCCTTTGA
At4g16780	HAT4	CATGAGCCCACTACTACTT	ACCTAGGACGAAGAGCGTCA
At2g44910	HB4	ACTCTCACCATGTGCCCTTC	TAGCGACCTGATTTTGTCTG
At5g20240	PI	GAACGCAAACAACAGAGTGG	TGGTCCAACATAGCACCAAG
At1g24260	SEP3	GAGTTTTGCAGTAGTTCGAGCA	GGGTCTCTGTAAGGCGTCA
At2g34600	JAZ7	AAATGCGACTTGGAACTTCG	CCGAACCGTCTGAACTTCTC
At5g60910	FUL	CCGAGACGTTTCACAAAGTG	TGCTCTTGATAGCTGCATCG
At2g42870	PAR1	TCTCTGTCACCGTCATGCTC	CGCCTCAATCTTTCCTTGA
At1g15520	PDR1	ATTTGCGATGCTCGTCTTCT	GTTTTCGACAGCTCGACTCC
At1g72260	THI2.1	TCTGGTCATGGCACAAGTTC	GAGTGTTTCATGGCACCACAC
At1g56650	PAP1	CGACTGCAACCATCTCAATG	TGTCCCCCTTTTCTGTTGTC
At2g28210	ACA2	CTTTTCTCGGATTGCTGGAA	CCTTTTAAACGACGGTCCAA

**Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en PCR cuantitativa.** En esta tabla se especifican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación específica de un fragmento de cDNA. Todos los oligonucleótidos han sido obtenidos de publicaciones anteriores (Ramírez-Parra et al., 2007), o diseñados según el programa primer3plus.

### 10.3. Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas para analizar la expresión del mensajero correspondiente, se obtuvieron por digestión con enzimas de restricción o por amplificación mediante PCR, a partir de los plásmidos donde están clonados los cDNAs de cada gen analizado. Estos fragmentos de DNA fueron purificados mediante columnas de "QIAquick" (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las sondas de DNA se marcaron con 40  $\mu$ Ci de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (Amersham-Pharmacia) mediante el método de extensión a partir de cebadores aleatorios desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983). Para ello se utilizó el sistema "Rediprime II DNA Random Prime Labelling system" (Amersham-Pharmacia). Después del marcaje, los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante el paso por columnas

“Microspin S200 HR” (Amersham-Pharmacia). Las hibridaciones de ácidos nucleicos se llevaron a cabo en tubos de vidrio conteniendo de 10 a 15 ml de solución de hibridación (Sambrook et al., 1989). Las membranas previamente obtenidas en los experimentos de northern blot, se prehibridaron a 65°C durante 2 horas y posteriormente se les añadió la sonda desnaturalizada, incubándose en agitación suave durante toda la noche. Tras la hibridación, las membranas se lavaron en condiciones cada vez más astringentes, comenzando con SSC 2X, 0.1% SDS, hasta llegar a 0.2X SSC, 0.1% SDS. Todas las incubaciones de lavado se realizaron a la misma temperatura a la que se realizó la hibridación, durante 20 minutos. Finalmente, las membranas fueron expuestas a películas radiográficas “Hyperfilm” (Amersham) entre pantallas intensificadoras, a -80°C, durante el tiempo necesario para la visualización de la señal.

## 11. Análisis de doble híbrido

Los análisis de interacción de doble híbrido en levaduras fueron realizados en la cepa Y190 mediante el sistema “MatchMaker two-hybrid” (Clontech). Los plásmidos pGBT8 y pDEST32 o pGAD, pDEST22 y pC86 se usaron para construcciones fusionadas con GBD (GAL4 Binding Domain) o GAD (GAL4 Activation Domain), respectivamente. Los cDNAs que codifican para *SWC6*, *ESD1/ARP6*, *SWC4*, *YAF9A* y *YAF9B* se obtuvieron mediante PCR y fueron posteriormente clonados en los vectores antes mencionados, usando la tecnología de recombinación por Gateway (Clontech) para algunos de los clones. A continuación, se llevó a cabo una selección de las levaduras transformadas con estos plásmidos, en un medio mínimo completo sin histidina, leucina ni triptófano, suplementado con distintas concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT), un inhibidor de la síntesis de histidina (0-25 mM).

## 12. Ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) en plantas

Mediante el sistema de recombinación Gateway se clonaron las diferentes secuencias de cDNA de los genes *SWC4*, *YAF9A* y *YAF9B* en los vectores GATEWAY derivados de los vectores E-YFP de Clontech, pBIFP-1, pBIFP-2 con el dominio N-t de la YFP fusionado en la posición C-t y N-t, respectivamente, y en los vectores pBIFP-3, pBIFP-4 con el dominio C-t de la YFP fusionado en la posición N-t y C-t, respectivamente. Una vez conseguidas las construcciones correspondientes, se procedió a transformar *A. tumefaciens* y se infiltró transitoriamente en plantas de *N. benthamiana*, junto con la construcción *pBIN::p19* que expresa un inhibidor del silenciamiento génico. La agroinfiltración se realizó en la 3ª semana post-germinación, en todas las hojas de la planta (las plantas en estas condiciones poseen entre 4-5 hojas, sin contar los cotiledones). Las hojas que mejor expresión transitoria mostraron fueron las más jóvenes. A partir de los stocks de células de *A. tumefaciens*, previamente transformadas con las construcciones de interés, se hicieron preinóculos en medio selectivo durante toda la noche.

Posteriormente se inoculó 50 ml de medio selectivo en el volumen necesario para dejar el cultivo a una D.O. de 0.2 y se dejó en agitación a 28°C hasta alcanzar una D.O. de 0.6-0.8. Después se centrifugó el cultivo a 4000 r.p.m. durante 5 minutos y se resuspendió el pellet en 10 ml de solución de inducción (2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM MES pH 5.6, 25 mM Glucosa, 200 mM Acetosiringona, 20 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 mM KCl, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01 mM FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O). Se dejó induciendo el cultivo durante 2-3h a temperatura ambiente. A continuación se midió la densidad óptica de la suspensión bacteriana para infiltrar la misma cantidad de cultivo. Las suspensiones bacterianas así obtenidas se mezclaron equivolúmicamente junto con la que contenía el inhibidor de silenciamiento y se infiltraron en el envés de la hoja de *Nicotiana* mediante una jeringuilla, calculando en todo momento el volumen de suspensión utilizado por cada planta. La recolección de las muestras a analizar se realizó a partir de los 2-3 días después de la infiltración.

### **13. Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

Las proteínas de interés se clonaron en fase de lectura en vectores que expresan la proteína GST (*Glutation-S-transferasa*), pGEX2TK (cedido por el laboratorio del Dr. Juan Carlos del Pozo). Estas proteínas de fusión se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21 Rosetta. La inducción de proteínas se realizó con IPTG 0.4 mM durante 2h, a 28°C. El cultivo se centrifugó y se resuspendió en una solución de PBS-Tween-20 0.1% (PBS-T), 1 mM PMSF y 25 µM de benzamidina. Las muestras se sonicaron en frío, 3 veces durante 15s y se incubaron con bolas pre-lavadas de GST durante 1h, en agitación a 4°C. Posteriormente se lavaron 3 x 10 minutos en agitación a 4°C con PBS-T y se conservaron en esta solución con un 10% de glicerol a -80°C. Las proteínas se cuantificaron por western blot usando geles SDS-PAGE, teñidos con azul de Coomassie.

#### 14. Ensayos de inmunoprecipitación (pull-down)

Para determinar las interacciones físicas entre SWC6 y ESD1/ARP6, y SWC4 y YAF9A, las construcciones que expresan SWC6 y SWC4 fueron introducidas en un vector pGEX2TK y expresadas en *E. coli* BL21 Rosetta. Las proteínas GST, GST-SWC6 o GST-SWC4 fueron purificadas mediante bolas de glutatión 4B sefarosa (GE Amersham) y se mantuvieron unidas en las bolas durante la incubación con ESD1/ARP6 o YAF9A, según el caso. Por su parte, las proteínas ESD1/ARP6 y YAF9A se prepararon mediante una reacción de transcripción-traducción con el sistema “TNT Quick Coupled Transcription-translation” (Promega) en presencia de [<sup>35</sup>S] metionina (Amersham Biosciences). Para el ensayo de pull-down, se utilizaron 500ng de GST o tampón de unión (20mM TRIS-HCl pH 7.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol, 0.01% Nonidet P-40) con 15µl de la reacción TNT y lavamos con tampón de unión suplementado con 500mM de NaCl. Tras la incubación en el tampón de unión, las muestras fueron hervidas con tampón Laemmli y analizadas mediante SDS-PAGE.

#### 15. Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a histonas de Arabidopsis

##### 15.1. Extracción de las histonas de células de Arabidopsis en cultivo

Los extractos enriquecidos en histonas de células de Arabidopsis se obtuvieron a partir de cultivos celulares (cepa MM2d; Fujiyama et al., 2002). Para la extracción de núcleos, se utilizaron 200ml de un cultivo celular de Arabidopsis crecido durante 4 días. Las células se filtraron con un kitasato y se congelaron a -80°C. Posteriormente, se homogenizaron en un mortero con N<sub>2</sub> líquido. A continuación, se resuspendieron en 100ml de tampón NIB (10mM Tris-HCl pH 9.5, 10mM EDTA pH 8.0, 100 mM KCl, 0.5M Sacarosa, 4mM espermidina, 1mM de espermina, 0.1% de β-mercaptoetanol). La suspensión de núcleos obtenida, se filtró a través de una membrana miracloth y de una membrana de nylon de 30µm de diámetro de poro. Se midió el volumen y se diluyó 1/20 en tampón NIB-T (NIB con 10% de Tritón X-100). Se incubó a 4°C durante 15 minutos y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos.

Para la obtención de las histonas a partir del extracto nuclear, se resuspendieron los núcleos en 4ml de tampón de lisis (320mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200mM Tris pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 10% glicerol, inhibidores de proteasas, “Protease Inhibitor Cocktail”, Sigma), y se lisaron mediante sonicación, 3 pulsos de 10s. El extracto así obtenido se incubó 15 minutos a 4°C, se centrifugó a 12000 r.p.m., 15 minutos y se

almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La cuantificación de las histonas extraídas de los cultivos celulares de *Arabidopsis* se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.

### **15.2. Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a histonas**

En estos ensayos se emplearon las proteínas recombinantes expresadas como fusiones a GST, purificadas como se describe en el apartado 13 y los extractos de histonas obtenidos según el procedimiento descrito en el apartado 15.1. En primer lugar, entre 1-2 $\mu\text{g}$  de la resina con las proteínas recombinantes unidas, se sometieron a un tratamiento con BSA al 1% en un tampón PBS con Tween-20 al 0.1% (PBS-T). A continuación, la resina se lava 3 veces con PBS-T y se resuspende en un tampón de unión (50mM NaCl, 20mM Tris pH 7.5, 25% glicerol, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM PMSF, 0.02% Tritón X-100) al que se añaden 200 $\mu\text{g}$  del extracto de histonas de *Arabidopsis*. Posteriormente, se incuba durante 2h a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación y se hacen 3 lavados de 10 minutos cada uno, uno de ellos con el tampón de lavado 2 (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% de Tritón X-100) y dos lavados más con PBS-T 1X. Con el fin de identificar histonas unidas a las proteínas recombinantes, las muestras resultantes se hirvieron con buffer Laemmli y se separaron electroforéticamente mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15%. Se transfirió el gel a una membrana Immobilon (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. La unión de las proteínas recombinantes al extracto de histonas se detectó mediante técnicas de western blot con los anticuerpos  $\alpha\text{H3}$ ,  $\alpha\text{H3Ac}$ ,  $\alpha\text{H3K4me3}$ ,  $\alpha\text{H3K27me3}$ ,  $\alpha\text{H4}$  y  $\alpha\text{H2B}$ . El revelado se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia con un kit "Immobilon Western" (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **16. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

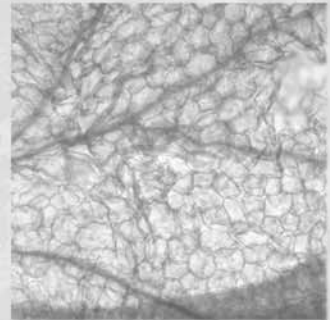
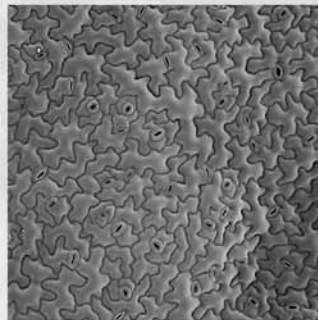
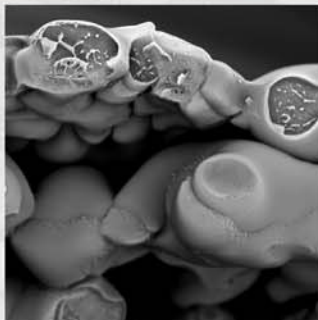
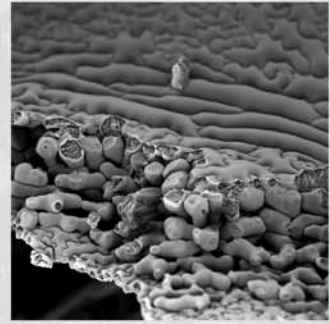
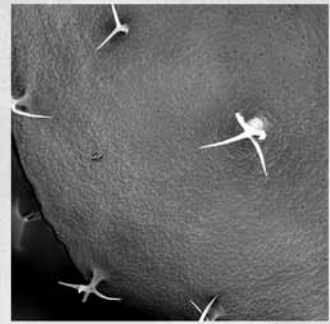
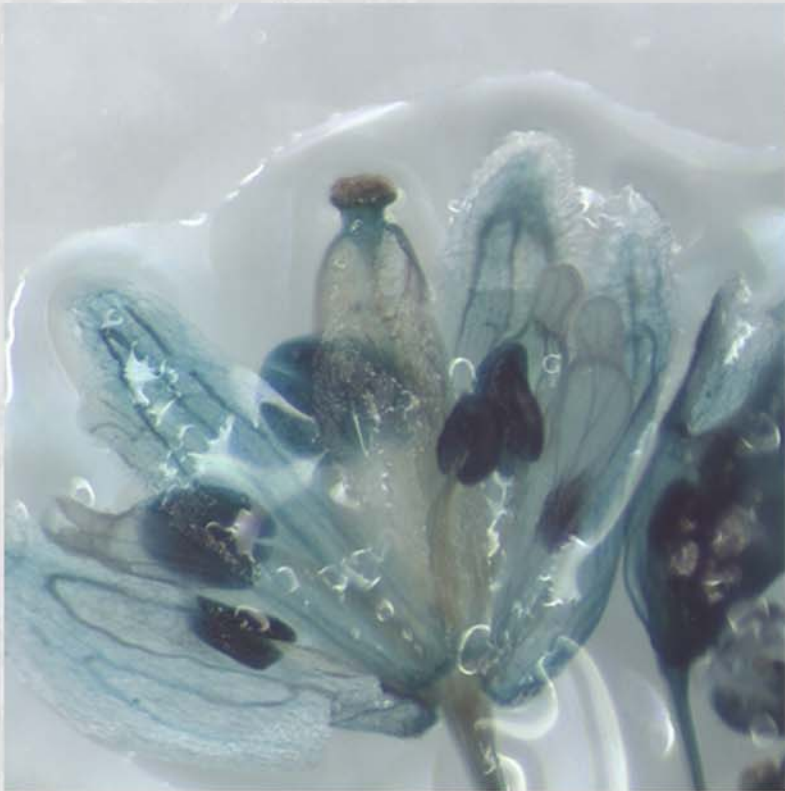
Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se llevaron a cabo según se describe en Ausín et al., 2004. Las proteínas unidas al DNA fueron fijadas mediante formaldehído, en plántulas cultivadas durante 10 días. Después del aislamiento de la cromatina, las fracciones de histona H3 acetiladas y metiladas fueron inmunoprecipitadas usando anticuerpos específicos. Uno de ellos reconoce residuos de lisina, K9 y K14 acetilados, y el segundo reconoce residuos de lisina 4 trimetilados ( $\text{K4me3}$ ) (06-599 y 07-473 de Upstate Biotechnology, respectivamente). La fijación fue revertida mediante incubación a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 2h, y el DNA se purificó con columnas de "QIAquick" (QIAGEN), eluyéndose en 40 $\mu\text{l}$  de TE pH 8.0. Se utilizó PCR semicuantitativa para amplificar dos fragmentos diferentes del gen *FLC* tal y como se



había descrito previamente en Martín-Trillo et al., 2006. Tanto las condiciones de PCR como la cuantificación del DNA amplificado se encuentran especificadas en Lázaro et al., 2008. Utilizamos la expresión de *UBQ10* como control interno para el análisis de ChIP. Para calcular la medida en que disminuye la acetilación de H3 o la metilación de las regiones de *FLC* analizadas en los mutantes, primero éstas fueron ajustadas respecto a la *UBQ10* en cada ensayo, y posteriormente, dichos valores fueron comparados de nuevo con sus respectivos controles silvestres.



# RESULTADOS





# 1. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN ORTÓLOGO SWC6 DE ARABIDOPSIS

## 1.1. Caracterización genética y molecular de SWC6 en Arabidopsis

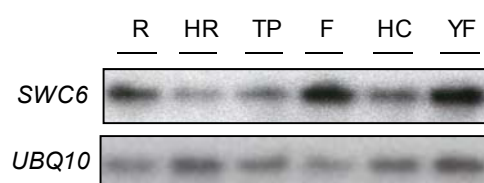
En Arabidopsis, el homólogo de la subunidad SWC6 del complejo SWR1 de levaduras está codificada por un gen único, designado como At5g37055, que contiene cuatro exones (Lázaro et al., 2008). Este gen codifica una proteína nuclear de 171 aminoácidos con un dominio HIT-Zinc finger característico (Choi et al., 2007). La proteína SWC6 se encuentra muy conservada en otros organismos, como en levaduras, donde Swc6 forma parte del complejo SWR1, o en mamíferos como ZNHIT1, componente del complejo SRCAP (Mizuguchi et al., 2004; Cai et al., 2005) (Tabla 1). La proteína SWC6 de Arabidopsis también está estrechamente relacionada con la proteína CIBP1 de *N. benthamiana*, identificada como una proteína de inclusión-interacción del virus cilíndrico Plum pox y con la proteína SWC6 de arroz (OsSWC6). Todas estas proteínas contienen en la región carboxilo-terminal un dominio de tipo HIT-Zinc finger con siete residuos de cisteínas y uno de histidina altamente conservados (Fig. 7).

AtSWC6	: -----MEEEMSN--RRVSNRIRKRVATKMAAALTSNDNR-----TQAAIARLEALEENDNGAIEVID	: 53
NtCIBP1	: -----MDEEMSNARRMSVRIKRVAPKMAAALASSDNR-----TQAMLARLEDALESDNAVVEQQP	: 55
OsSWC6	: -----MEGEEENVGPFRRTSARIRRMATRMASALASSDNR-----AQALARLEALEESDNAGPEVVD	: 58
ScSWC6	: MKALVEEIDKKTYNPDIFYFTSLDPQARRYTSKINKQGTISTSRPVKRIINYSLADLEARYTSRSEGDGNSISR	: 74
DdHIT	: -----MSDSIIIVNIETPQSSKFKSQISKRYRVITSEEDRRNLKEKVLISARLESIDDDNEQQPIGS	: 59
DmHIT	: -----MTGRESNRIKDAEKRVLDSTAR-----QRRARKALEALEQDN-----Y	: 39
HsZNHIT1	: -----MVEKKTIVRSQDPGQRRVLDRAAR-----QRRINRQLEALEENDN-----F	: 40
AtSWC6	: LNDDE-----	: 58
NtCIBP1	: LDDDD-----	: 60
OsSWC6	: LNDDD-----	: 63
ScSWC6	: QDDRNSKNSHSFEERYTQQEILQSDRRFMELNTENFSDLFNVPTLLSDLTGVPDRDRIESTTKPIISQTS DGLSAL	: 148
DdHIT	: RGDEE-----	: 64
DmHIT	: HDDPH-----	: 44
HsZNHIT1	: QDDPH-----	: 45
AtSWC6	: -----EASLDEDDDLGYLQKQHKGS--KRKTRQAKALEARKAPKSLLELLIQEANLESLS	: 112
NtCIBP1	: -----EASLDEDDQV--FHKKYPKGT--KRKTRQAKALENKRAPKSLLELLIREANLESLPP	: 112
OsSWC6	: -----EYGSADDEHDVLMQRKQSKNM--KRKTRQAKALE--KKAARSFMDVLEQANLESLSPP	: 116
ScSWC6	: MGGSSFVKEHSKYGHGWVLPETLREIQLSYKSTKLPKPKRKNNTNRTVALKKVLSKKRNLSHFDSDALLNLM	: 222
DdHIT	: -----DNDYNDDENEIVYTPVNVKRR--LFIAREKKKNEKKSMNLNNDVLEKSYLETFFD	: 118
DmHIT	: -----ADL--VMSKKLPKFDQSLKTGKEKKGKRGAEYFLVKYRKNFQQLLEED-----KD	: 93
HsZNHIT1	: -----AGLPQLGKRLPQFDDADTGKKKKKTR--GDHFKLRFKKNFQALLLEEQNLS--VA	: 96
AtSWC6	: HVPTYLKAAVGPPESSSRRYLCSVCG--YIAGNCCCLCGMRFCSIRCONIHKDTRCQKFVA--	: 171
NtCIBP1	: HVPTYLRAAVGPPESSISRREHCTVCG--FSANYTCVCGMRFCSIKCQTHKDTRCLKFVA--	: 171
OsSWC6	: HVPTYSRAAVGPPESTSSRREHCSVCG--STANYTCVRCGTRFCSRCRCQVIHNDTRCLKFVA--	: 175
ScSWC6	: NVIYHNVYNKRYFKVLEPLITTCISICGGYDSISCVNCGNKICSVSCFKLHNETRCRNR---	: 280
DdHIT	: HVPTYISVQS--KFSIFPPRHFCSICG--YI GAVTCKQCSSRYCSIKCFNYHNETRCGSIYT	: 177
DmHIT	: KQENMESAAAPAFQK--PLRHFCAVCG--NFSLYSCTACGTRYCCVRCLOTHQDTRCLKWTA--	: 151
HsZNHIT1	: EGENYLTACAGPEER--PQRPFCAVCG--FPSPYTCVSCGARVCTVRCGLGTHQETRCCLKWTV--	: 154

**Fig. 7. SWC6 codifica una proteína de tipo HIT-Zinc finger.** Comparación de secuencias de SWC6 de *Arabidopsis thaliana* (AtSWC6) con los homólogos en *Nicotiana tabacum* (NtCIBP1), *Oryza sativa* (OsSWC6), *Saccharomyces cerevisiae* (ScSWC6), *Dictyostelium discoideum* (DdSWC6), *Drosophila melanogaster* (DmSWC6) y *Homo sapiens* (HsZNHIT1). Los residuos de aminoácidos marcados en negro indican que son idénticos y los que se observan en gris son funcionalmente similares en todas las secuencias. Las regiones de las proteínas contenidas en la caja corresponden al dominio HIT Zinc-finger.

## 1.2. Análisis del patrón de expresión de *SWC6*

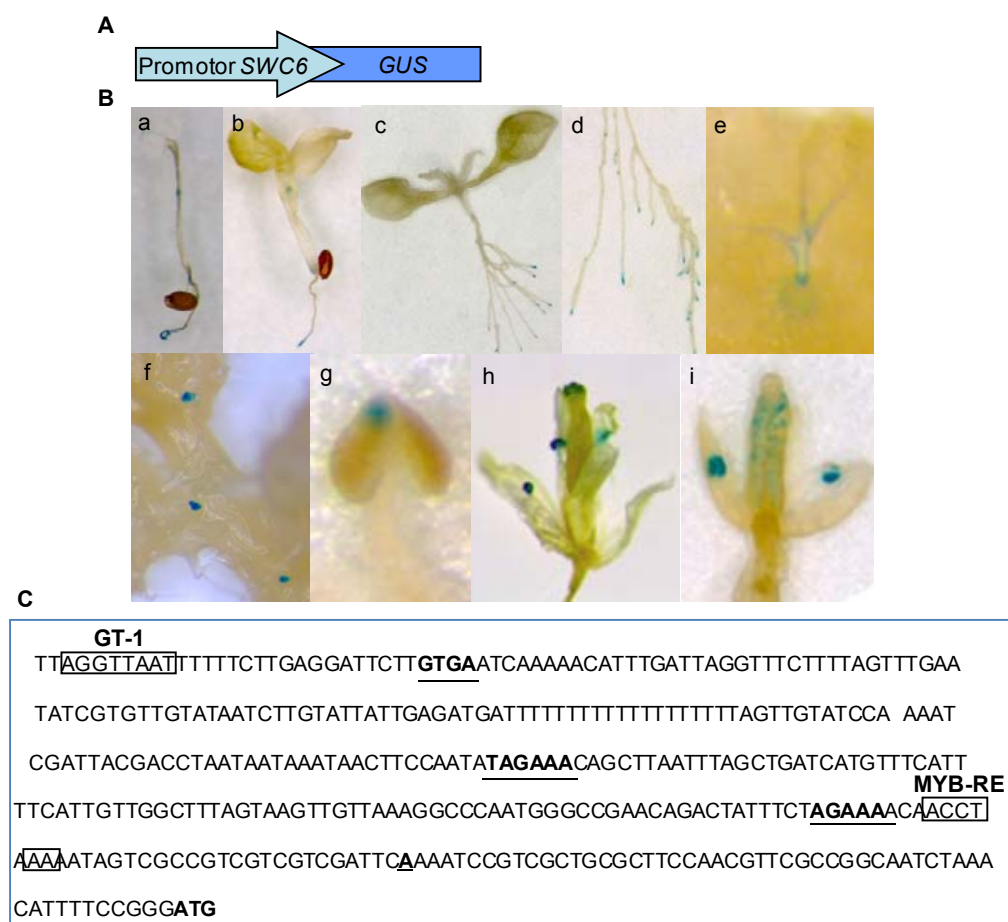
Con el fin de determinar el patrón de expresión de *SWC6* en plantas, empleamos RNA extraído de diferentes órganos de *Col* como raíces, hojas de roseta, tallo principal, flores, hojas caulinares y yemas florales, para la preparación de cDNA, que se usó como molde. Mediante experimentos de RT-PCR semicuantitativa observamos que el transcrito de *SWC6* se expresa en todos los tejidos estudiados aunque de manera más elevada en raíces, flores y yemas florales (Fig. 8). Similares perfiles de expresión para el gen *SWC6* se muestran en las bases de datos Genevestigator ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch); Zimmermann et al., 2004).



**Fig. 8. Expresión de *SWC6* en distintos órganos de plantas de *Arabidopsis*.** Los ensayos de RT-PCR semicuantitativa fueron realizados con RNA preparado de diferentes órganos: R, raíces; HR, hojas de roseta; TP, tallo principal; F, flores; HC, hojas caulinares; YF, yemas florales, del ecotipo *Col*, cultivadas durante 25 días en condiciones de DL. Los productos de RT-PCR se hibridaron con una sonda específica del gen *SWC6*. Se utilizó la expresión de *UBQ10* como control de carga.

De la misma manera, para analizar en detalle el patrón de expresión de *SWC6*, generamos plantas transgénicas en fondo *Col*. Estas plantas expresan una fusión transcripcional de 353 pb de la región promotora de *SWC6* con el gen *GUS* (*SWC6p::GUS*) (Fig.9A). De las plantas transgénicas obtenidas, se analizaron 12 líneas independientes, de las que seleccionamos tres líneas homocigotas, portadoras de una única inserción, para analizar en detalle el patrón de expresión del gen reportador *GUS*. En la figura 9 se muestra el patrón de expresión del gen *GUS* en una de estas líneas, en distintos estadios del desarrollo. En dicha línea, se detectó la expresión del gen delator en tejidos y órganos donde las células se dividen activamente, como el meristemo apical de la raíz y del tallo, en los primordios de raíces laterales, en tricomas, inflorescencias y en flores (Fig. 9B). La expresión del gen reportador *GUS* resultó ser particularmente elevada en anteras (Fig. 9B). Por el contrario, la expresión de *GUS* en plantas *SWC6p::GUS* es muy baja en estambres, hojas, semillas y silicuas. El análisis de los dominios o cajas reguladoras presentes en la región del promotor de *SWC6* que hemos fusionado a *GUS*, nos reveló la presencia de varios elementos reguladores en *cis*. Entre ellos se incluyen secuencias de unión del factor transcripcional GT-1, una proteína de

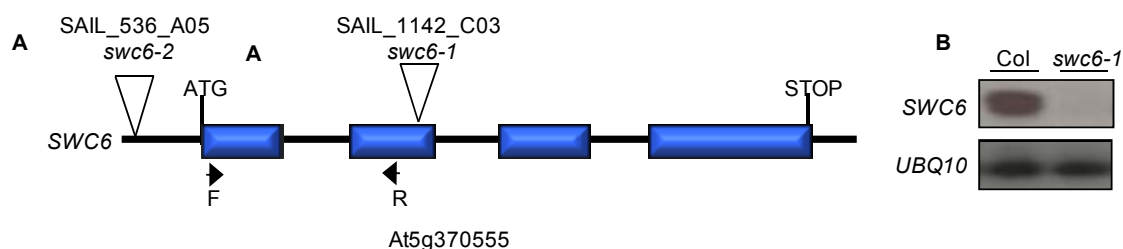
unión a DNA relacionada con la respuesta a la luz, así como elementos de respuesta a factores de tipo MYB y motivos GTGA y AGAAA, similares a los conservados en la región promotora de algunos genes específicos de anteras/polen que es consistente con el patrón de expresión de *SWC6* observado en anteras (Fig. 9C).



**Fig. 9. Análisis de la expresión del promotor de *SWC6* fusionado al gen reportador *GUS*.** (A) Esquema de la construcción *SWC6p::GUS* introducida en plantas Col. (B) Tinción histoquímica de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa realizada en plántulas cultivadas durante (a) 2, (b) 4 y (c) 8 días, en (d) raíces laterales, (e) tricomas, (f) región del meristemo apical, (g) anteras y (h, i) flores. (C) Secuencia nucleotídica de la región promotora y 5'UTR del gen *SWC6*. El triplete ATG al final de la secuencia representa el codón iniciación. La primera base del transcrito (+1) está en negrita y subrayada. Las secuencias GTGA y AGAAA, presentes en las regiones reguladoras, son similares a los motivos conservados en la región promotora de algunos genes específicos de anteras/polen y se indican en negrita y subrayados. El motivo de unión de GT-1 y el elemento de respuesta a MYB están enmarcados en cajas.

### 1.3. Caracterización fenotípica de un alelo de pérdida de función para *SWC6*

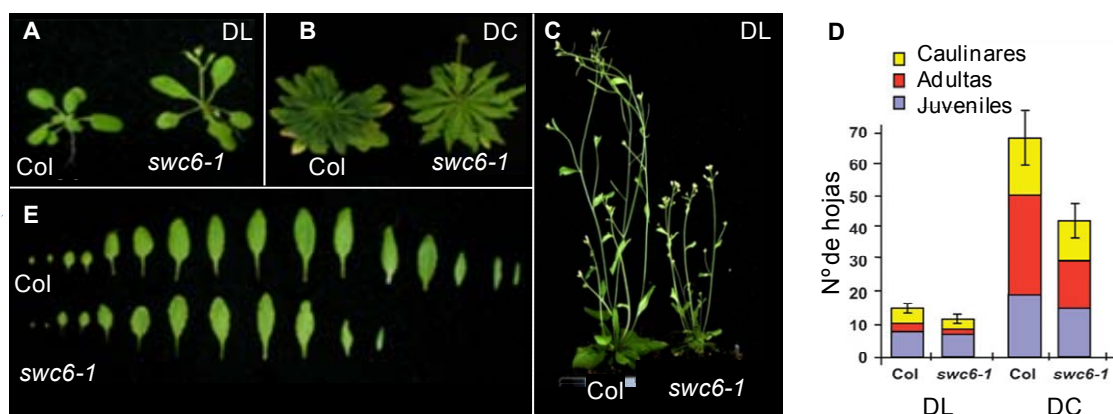
Para determinar la posible función de *SWC6* en el control del tiempo de floración, así como en otros aspectos del desarrollo, realizamos un análisis detallado del fenotipo de pérdida de función de *SWC6* en *Arabidopsis*. En primer lugar, nos centramos en la identificación de líneas portadoras de inserciones de T-DNA en dicho gen. Como resultado obtuvimos dos líneas, SAIL\_1142\_C03 y SAIL\_536\_A05 que designamos como *swc6-1* y *swc6-2*, respectivamente (Fig.10A). La línea SAIL\_1142\_C03 (*swc6-1*) presenta una inserción de T-DNA en el segundo exón del locus At5g37055, en la posición correspondiente al nucleótido 146 de la región codificante. Para los análisis de RT-PCR diseñamos los cebadores directo y reverso, situados por encima de la inserción de T-DNA, y demostramos que en plantas mutantes homocigotas *swc6-1* no se detectaba el RNA mensajero (mRNA) de *SWC6* (Fig.10B). De la misma manera, demostramos que la línea SAIL\_536\_A05 (*swc6-2*) contiene un T-DNA insertado en la región del promotor, por encima de la secuencia 5'UTR del mRNA de *SWC6*. Los análisis de RT-PCR tampoco detectaron la expresión del mRNA de *SWC6* en *swc6-2* (datos no mostrados) indicando que ambas líneas mutantes suponen la pérdida de función de *SWC6*.



**Fig. 10. Estructura génica de *SWC6* y su expresión en mutantes *swc6-1*.** (A) Localización de las inserciones de T-DNA identificadas en el gen *SWC6* para los alelos *swc6-1* y *swc6-2*. Las cajas azules representan los exones del gen, la línea negra los intrones y las regiones 5' y 3'UTR. Los triángulos invertidos representan las inserciones que dan lugar a las mutaciones *swc6-1* y *swc6-2*. Las flechas hacen referencia a los cebadores directo (F) y reverso (R) utilizados para generar la sonda empleada para analizar la expresión de *SWC6* mediante experimentos de RT-PCR. (B) Expresión de *SWC6* en mutantes *swc6-1*. Análisis de RT-PCR que muestra los niveles de expresión del mRNA de *SWC6* en plantas silvestres y mutantes *swc6-1* cultivadas bajo fotoperiodos de DL. Usamos como control de este experimento la expresión del gen *UBQ10*.

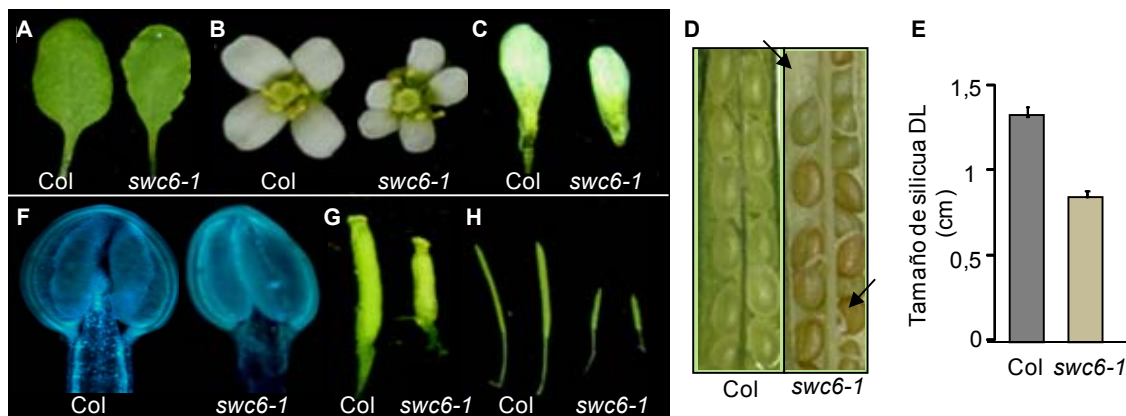


Ya que ambos alelos mostraban alteraciones fenotípicas similares, elegimos *swc6-1* para realizar todos los análisis fenotípicos y genéticos posteriores. Observamos que la mutación *swc6-1* es recesiva, ya que las plantas portadoras de dicha mutación en heterocigosis presentan un fenotipo silvestre, mientras que las plantas homocigotas para *swc6-1* presentan un claro fenotipo de floración temprana, principalmente bajo fotoperiodos de DC, no inductivos (Fig.11; Tabla 10). Esta precocidad en el tiempo de floración fue asociada a una reducción en la longitud de todas las fases del desarrollo vegetativo de la planta mutante, que se cuantificó en base a la morfología de las hojas y la distribución de los tricomas (Telfer et al., 1997) (Fig. 11D). Esta reducción es más dramática para hojas adultas de roseta, que mostraron una fuerte disminución en *swc6-1* tanto en DC como DL (Fig. 11D). Este comportamiento es similar al que presentan otros mutantes de floración temprana como *esd1-10*, *pie1*, *esd4* y *ebs*, que también muestran una importante reducción de la fase vegetativa adulta (Gómez-Mena et al., 2001; Reeves et al., 2002; Martín-Trillo et al., 2006). Además de un fenotipo de floración temprana, las plantas *swc6-1* también muestran complejas alteraciones pleiotrópicas del desarrollo, tanto a nivel vegetativo como reproductivo. Así, el mutante *swc6-1* produce más tallos de coflorescencias que la planta silvestre. Esto va acompañado de un acortamiento de los entrenudos de la inflorescencia, lo que origina una reducción en la longitud de la inflorescencia y en la dominancia apical (Fig. 11). Por otro lado, el mutante *swc6-1* presenta hojas con márgenes aserrados, más pequeñas y más curvadas que la planta silvestre (Fig. 11E; 12A).



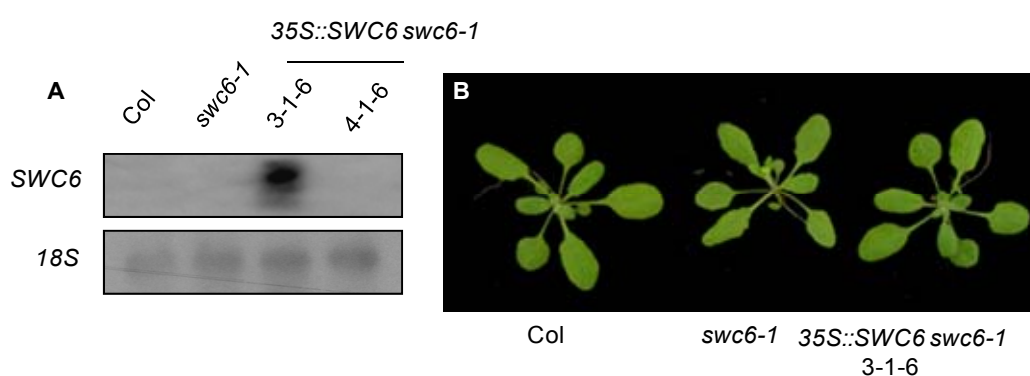
**Fig. 11. Fenotipo de floración de los mutantes *swc6-1*.** (A) Fenotipo del tiempo de floración del mutante *swc6-1* cultivado durante 2 semanas bajo condiciones de DL y (B) durante 4 semanas bajo condiciones de DC. (C) Plantas Col y *swc6-1* cultivadas durante 4 semanas bajo fotoperiodo de DL. (D) Histograma comparativo del número de hojas juveniles, adultas y caulinares, en Col y *swc6-1*, cultivadas bajo fotoperiodos de DL y DC. (E) Hojas de roseta y caulinares de Col y *swc6-1* cultivadas en condiciones de DL. Todas las hojas, incluidos los cotiledones, se presentan en orden de producción.

Como se muestra en la figura 12, las flores de *swc6-1* presentan varias alteraciones en su desarrollo, entre las que se incluye una reducción del tamaño en general, y pétalos más pequeños y ligeramente arrugados, en comparación con las flores de plantas silvestres (Fig. 12B y C). Otro rasgo característico de las flores mutantes *swc6-1*, es la presencia de órganos extras. Este fenotipo es más extremo en DC, donde las flores contienen  $5.8 \pm 0.8$  sépalos y  $5.7 \pm 0.9$  pétalos por flor (Fig. 12B). Las anteras del mutante también son más pequeñas y presentan una forma de corazón característica de anteras inmaduras (Fig. 12F). El mutante *swc6-1* muestra una disminución de la fertilidad asociada a una reducción en la cantidad de polen. Los carpelos y silicuas mutantes tienen aproximadamente la mitad de la longitud, comparados con los de tipo silvestre y en las silicuas se pueden observar algunos óvulos abortados (Fig. 12D-E, G-H). Un fenotipo similar se ha descrito para mutantes *pie1* y *esd1/arp6*, lo que sugiere que estas proteínas deben formar parte de un complejo que regula múltiples aspectos del desarrollo de *Arabidopsis* (Noh y Amasino, 2003; Martín-Trillo et al., 2006).



**Fig. 12. Caracterización morfológica de hojas, flores y frutos del mutante *swc6-1*.** (A) Hojas de roseta de plantas silvestres y *swc6-1* cultivadas en condiciones de DC. (B) Flores individuales que presentan un aumento en el número de pétalos en mutantes *swc6-1* cultivados en DC. (C) Pétalos independientes que muestran un tamaño más reducido y apariencia arrugada en los mutantes. (D) Corte longitudinal de una silicua de Col y *swc6-1*, donde se observan óvulos abortados. (E) Cuantificación de la longitud de las silicuas en DL, medido en cm. (F) Tinción DAPI de las anteras de plantas silvestres y mutantes *swc6-1*. (G) Gineceo de flores de plantas silvestres y mutantes *swc6-1*. (H) Silicuas de Col y mutantes *swc6-1*.

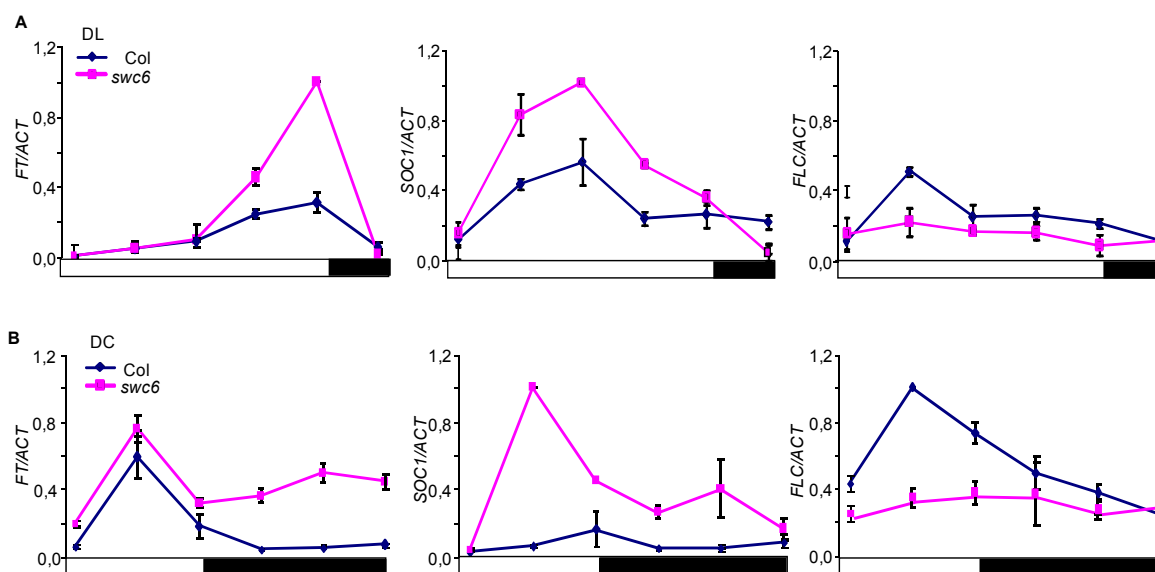
Para complementar el fenotipo originado por la mutación *swc6-1*, se transformaron estas plantas mutantes con una construcción del cDNA del At5g37055 bajo el control del promotor constitutivo del gen *35S* (Assaad y Signer, 1990) (Fig. 13). Mediante análisis de northern blot hemos demostrado una fuerte acumulación del mRNA de *SWC6* en dichas líneas transgénicas, que además, complementan todos los defectos del desarrollo observados en el mutante *swc6-1* (Fig. 13; Tabla 10). Sin embargo, el análisis de las líneas de sobreexpresión de *SWC6* sobre fondo silvestre no mostró ninguna alteración fenotípica adicional, lo que indica que la sobreexpresión de estos genes, no causa un retraso en el tiempo de floración.



**Fig. 13. Fenotipo de las líneas sobreexpresoras de *SWC6*.** (A) Análisis de northern blot que indican los niveles de expresión de *SWC6* en Col, *swc6-1* y en las líneas transgénicas [35S::*SWC6*] *swc6-1*, 3-1-6 y 4-1-6, una planta representativa que no muestra complementación del fenotipo mutante *swc6-1*. Se utilizó como control de carga y de la integridad de los RNAs una sonda del gen *18S ribosomal*. (B) Plantas de Col, *swc6-1* y transgénicas [35S::*SWC6*] *swc6-1* (línea 3-1-6) cultivadas durante 2 semanas en condiciones de DL.

#### 1.4. Análisis de la expresión de genes de floración en mutantes *swc6-1*

Puesto que los mutantes *swc6-1* presentan un claro fenotipo de floración temprana, nos propusimos realizar un análisis de expresión, a lo largo del día, de los principales genes implicados en el control del tiempo de floración, *FLC*, *FT* y *SOC1* (Fig. 14). De esta manera comprobamos que la aceleración en el tiempo de floración de *swc6-1* se debe a un aumento en la expresión de *FT* y *SOC1* y a un descenso de *FLC*, tanto en DL como en DC, lo que indica que *SWC6* participa en el control de la transición floral mediante la regulación de la expresión de estos genes característicos de la floración.



**Fig. 14. Análisis de la expresión de los genes de floración *FT*, *SOC1* y *FLC* en mutantes *swc6-1* a lo largo del día.** (A) Análisis de expresión mediante qPCR con cDNAs obtenidos a partir de RNA extraído de plántulas Col y *swc6-1* cultivadas, durante 11 días en condiciones de DL y, (B) durante 19 días en condiciones de DC y recogidas cada 4 horas, durante 24 horas. La hora 0 corresponde al inicio del periodo de iluminación. Los niveles de expresión relativa fueron normalizados mediante la expresión del gen constitutivo  $\beta$ -*ACTIN1* (*ACT1*).

### 1.5. Análisis genético de la interacción de *SWC6* con genes de la ruta autónoma y alelos activos de *FRI*

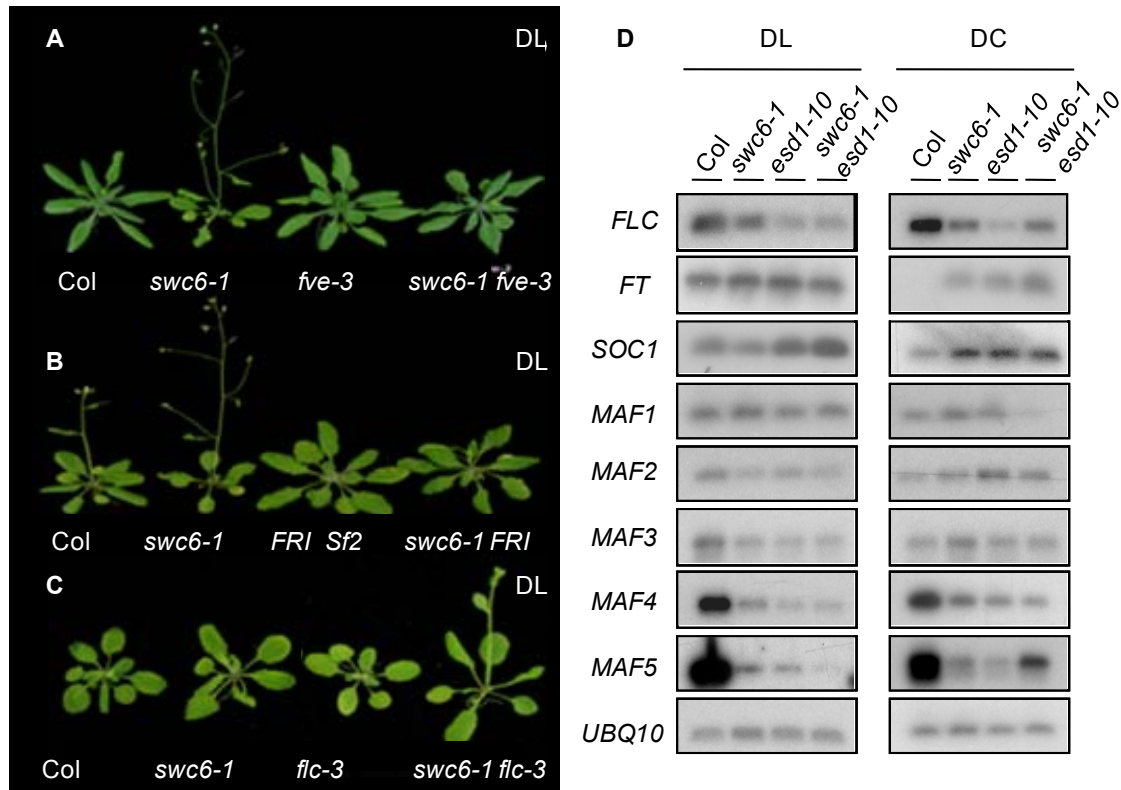
Como demuestran los resultados del análisis de expresión de los principales genes de floración, el fenotipo de floración temprana de *swc6-1* se corresponde con un aumento en la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* y un descenso en la expresión de *FLC* (Fig. 14), lo que sugiere un importante papel de *SWC6* en la activación de algunos de los represores florales, como *FLC* o alternativamente, en la regulación negativa de las rutas de inducción floral descritas. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, hemos comprobado que las mutaciones que afectan a *ESD1/ARP6*, suprimen el fenotipo de floración tardía de plantas portadoras de alelos activos de *FRI* y de los mutantes de la ruta autónoma (Martín-Trillo et al., 2006). Por esta razón, el análisis genético de *swc6-1* para determinar su participación en las rutas que controlan el tiempo de floración, fue enfocado inicialmente a la combinación de dicha mutación con estos genotipos, que presentan elevados niveles de expresión de *FLC*.

Para estudiar la posible interacción entre *SWC6* y los genes de la ruta autónoma, se analizó el fenotipo de floración del doble mutante *swc6-1 fve-3* (Fig. 15A). En condiciones de DL, algunos de los dobles *swc6-1 fve-3* eran indistinguibles de *swc6-1*, aunque, en promedio, *swc6-1 fve-3* produce algunas hojas más que el alelo *swc6-1* (Tabla 10). Este resultado indica que el fenotipo de floración tardía del mutante *fve-3* requiere del gen *SWC6*. La interacción casi epistática de la mutación *swc6-1* sobre *fve-3* sugiere que el fenotipo de floración temprana del mutante *swc6-1* podría deberse bien a un aumento de la actividad de la ruta autónoma por debajo de *FVE* ó bien a la eliminación de los requerimientos necesarios para la actividad de la ruta autónoma, causando una reducción de la expresión de *FLC*.

Cuando la mutación *swc6-1* se introdujo en plantas Col con un alelo activo de *FRI* (*FRI Sf2*) (Michaels y Amasino, 1999), que muestran un fenotipo de floración muy tardío, *swc6-1* suprimió parcialmente este fenotipo, puesto que las plantas *swc6-1 FRI-Sf2* muestran una floración mucho más temprana que aquellas silvestres con el alelo *FRI* activo (Fig. 15B; Tabla 10). Los resultados de la expresión de los genes de floración obtenidos por qPCR fueron corroborados mediante aproximaciones de RT-PCR semicuantitativa (Fig. 15D). Así, los niveles del mensajero de *FLC* se redujeron claramente en los mutantes *swc6-1*, en comparación con su expresión en el parental silvestre (Fig. 15D), lo que indica que, posiblemente *SWC6* sea necesario para mantener niveles elevados de la expresión de *FLC*, ya sea promovido por *FRI* afectando a la expresión de *FLC*, o por mutaciones que afectan a la ruta autónoma. Además, la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1*, normalmente reprimidos por *FLC* (Moon et al., 2003), aumentan en el mutante *swc6-1* en condiciones de DC donde el fenotipo de floración temprana del mutante es más visible (Fig. 14, 15D).

Aunque los efectos de la mutación *swc6-1* en el tiempo de floración son observados más fácilmente en fondos genéticos de floración tardía tales como *FRI* y *fve-3*, el hecho de que *swc6-1* florezca más temprano que la cepa de floración rápida silvestre, Col, sugiere que además de la regulación de la expresión de *FLC*, *SWC6* juega un papel adicional en el control del tiempo de floración. Para determinar la parte del fenotipo de floración temprana de *swc6-1* que es independiente de *FLC*, se examinó el efecto fenotípico de la mutación *swc6-1* sobre fondo mutante *flic-3* nulo (Michaels y Amasino, 1999). Cuando combinamos ambas mutaciones, observamos una reducción mayor en el número de hojas, que el producido por *flic-3* (Fig. 15C, Tabla 10). Al igual que ocurre con *ESD1/ARP6*, la pérdida de función de *SWC6* también disminuye la expresión de otros miembros de la familia de genes *FLC/MAF*, particularmente *MAF4* y

*MAF5* (Fig. 15D), sugiriendo que estos genes *MAF* podrían representar dianas adicionales para la función de *SWC6*, lo que confirmaría que la mutación *swc6-1* también tiene un efecto independiente de *FLC* en el control del tiempo de floración.



**Fig. 15. La mutación *swc6-1* suprime el fenotipo de floración tardía dependiente de *FLC* aunque también presenta un efecto independiente de *FLC* en el control del tiempo de floración.** (A) Fenotipo de floración del doble mutante *swc6-1 fve-3* cultivado en condiciones de DL. (B) Fenotipo de floración de líneas donde un alelo activo de *FRI* es combinado con *swc6-1*, cultivadas en condiciones de DL. (C) Fenotipo de floración del doble mutante *swc6-1 flc-3* cultivado en condiciones de DL. (D) Análisis de expresión de los genes *FLC*, *FT*, *SOC1* y *MAF(1-5)*, en plantas Col, *swc6-1*, *esd1-10* y en el doble mutante *swc6-1 esd1-10*. El RNA total se extrajo a partir de 50 plantas cultivadas durante 8 días en condiciones de DL y 23 días en condiciones de DC, a las 8 horas y a las 16 horas después del amanecer en DC y DL, respectivamente. Para la expresión de *SOC1*, se cogieron las muestras a las 4 y a las 8 horas después del amanecer en DC y DL, respectivamente. Los productos de RT-PCR se transfirieron e hibridaron con sondas específicas para cada gen. Se utilizó la expresión de *UBQ10* como control de carga.

Genotipo	Día Largo	Día Corto
Col	13,3 ± 1,5	69,5 ± 4,5
<i>swc6-1</i>	9,5 ± 0,6	38,5 ± 4,6
<i>esd1-10</i>	8,9 ± 0,7	31,8 ± 8,3
<i>swc6-1 esd1-10</i>	7,9 ± 0,3	31,3 ± 6,3
<i>fve-3</i>	34,3 ± 3,9	>120
<i>swc6-1 fve-3</i>	13,7 ± 1,6	>100
<i>FRI Sf2</i>	34,7 ± 7,1	>100
<i>swc6-1 FRI Sf2</i>	21,2 ± 3,7	>100
<i>flc-3</i>	12,1 ± 1,4	62,7 ± 4,1
<i>swc6-1 flc-3</i>	8,7 ± 0,7	40,5 ± 3,3
<i>sdg8-1</i>	9 ± 0,7	12 ± 1
<i>swc6-1 sdg8-1</i>	7,7 ± 1,1	7,7 ± 1,9
<i>35S::SWC6 swc6-1(3-1-6)</i>	14,6 ± 1,2	ND
<i>35S::SWC6 swc6-1(4-1-6)</i>	8,9 ± 0,5	ND

**Tabla 10. Cuantificación del tiempo de floración de los diferentes genotipos analizados.** Cuantificación del tiempo de floración medido en número de hojas totales de Col, dobles mutantes con *swc6-1* y sus parentales, y líneas de sobreexpresión *35S::SWC6* en fondo mutante, cultivadas en condiciones de DL y DC; (ND: No determinado).

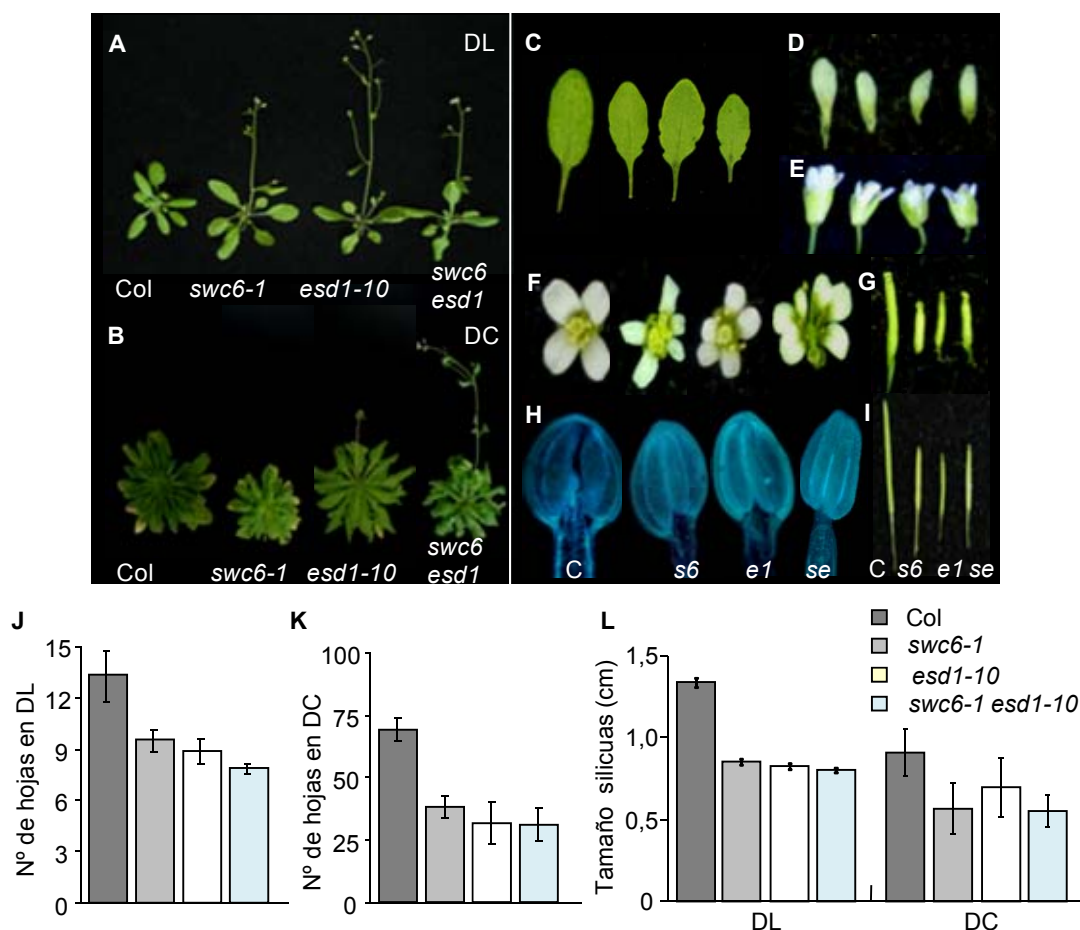
## 1.6. Interacción genética de los loci *SWC6* y *ESD1/ARP6* e interacción física de las proteínas que codifican

Todas las observaciones que hemos descrito anteriormente indican que los mutantes *swc6-1* muestran unas características fenotípicas muy similares a las del mutante *esd1-10* (Martín-Trillo et al., 2006). Por lo tanto, es posible que *SWC6* y *ESD1/ARP6* actúen en la misma ruta o alternativamente, participen en rutas diferentes pero paralelas, controlando procesos similares. Para profundizar en esta hipótesis, generamos dobles mutantes *swc6-1 esd1-10*.

Como se muestra en la figura 16A, el fenotipo del doble mutante *swc6-1 esd1-10* es casi indistinguible del fenotipo de *esd1-10*. Así, el tiempo de floración de *swc6-1 esd1-10* es prácticamente idéntico al de *esd1-10* (Tabla 10) y la expresión de los genes integradores florales en el doble mutante es muy similar a la observada en los mutantes sencillos *esd1-10* y *swc6-1* (Fig. 15D). Además, los fenotipos vegetativo y reproductivo del doble mutante *swc6-1 esd1-10* son bastante similares a los observados en *esd1-10* (Fig. 16). El doble mutante *swc6-1 esd1-10* también presenta menor porte en general, menor tamaño de las hojas de roseta que también presentan márgenes aserrados (Fig.



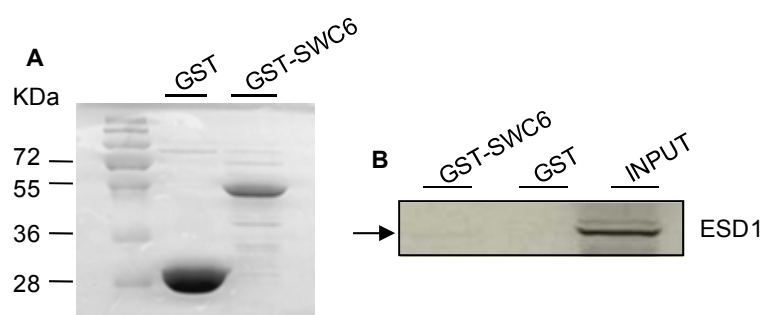
16A-C). Las flores son más pequeñas, si las comparamos con el ecotipo silvestre y muestran órganos extras (Fig. 16D-F). Al igual que los mutantes *swc6-1*, los dobles mutantes *swc6-1 esd1-10*, tienen carpelos y silicuas de menor tamaño que Col y las anteras son más pequeñas y presentan una reducción en la cantidad de polen (Fig. 16G-I). Por tanto, todas estas características observadas en el doble mutante *swc6-1 esd1-10* sugieren que *SWC6* y *ESD1/ARP6* actúan en la misma ruta genética.



**Fig.16. Interacción genética entre los loci *SWC6* y *ESD1/ARP6*.** (A) Fenotipo de floración de plantas Col, *swc6-1*, *esd1-10* y del doble mutante *swc6-1 esd1-10*, cultivadas en condiciones de fotoperiodo de DL y (B) en condiciones de DC. (C) Defectos pleiotrópicos en órganos vegetativos y reproductivos observados en el doble mutante *swc6-1 esd1-10*. Fotografía de hojas de roseta, (D) pétalos, (E) tamaño de flores de Col, *swc6-1*, *esd1-10* y *swc6-1 esd1-10*. (F) Las flores de los mutantes sencillos y el doble mutante *swc6-1 esd1-10* presentan órganos extras. (G) Menor tamaño de los carpelos. (H) Anteras teñidas con DAPI. (I) silicuas de Col (C), *swc6-1*(s6), *esd1-10* (e1) y *swc6-1 esd1-10* (se). (J) Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DL y (K) en DC. (L) Cuantificación del tamaño de silicuas de los mutantes sencillos y dobles, en condiciones de DL y DC, medido en cm.

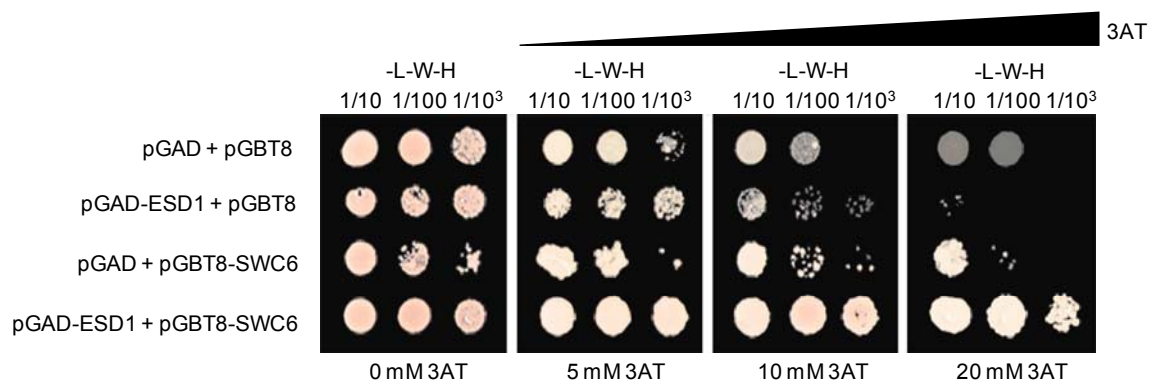


Ante la posible existencia de un complejo SWR1 en plantas, similar al descrito en levaduras, nos propusimos analizar la posible interacción física entre las proteínas SWC6 y ESD1/ARP6, en Arabidopsis. Para ello, realizamos inicialmente experimentos de pull-down *in vitro* usando una fusión de GST con la proteína SWC6 y una proteína ESD1/ARP6 preparada a partir de la traducción *in vitro* con metionina marcada radiactivamente ( $S^{35}$ ) (Fig. 17). Como se muestra en la Fig. 17B, la proteína ESD1/ARP6 es capaz de interactuar con la proteína de fusión GST-SWC6, pero no con la proteína GST sola, confirmando la interacción descrita en levaduras y apoyando la existencia de un complejo SWR1 en Arabidopsis, donde SWC6 y ESD1/ARP6 interactúan físicamente.



**Fig.17. Ensayo de inmunoprecipitación con las proteínas SWC6 y ESD1/ARP6.** (A) GST y la proteína de fusión GST-SWC6 se incubaron con la proteína ESD1 marcada con [ $^{35}$ S] Met. (B) La proteína ESD1 se visualizó después de exposición y autorradiografía del gel.

Para confirmar esta interacción, a continuación realizamos ensayos de doble híbrido en levaduras. La secuencia completa de la proteína SWC6 se expresó fusionada al dominio de unión (GBD) del factor transcripcional GAL4, y la secuencia de la proteína ESD1/ARP6 se fusionó al dominio de activación (GAD) de GAL4. Como se muestra en la figura 18, las levaduras que coexpresan proteínas de fusión GAD-ESD1 y GBD-SWC6 fueron capaces de crecer en medio selectivo sin histidina y en presencia del inhibidor 3-AT, debido a la activación del gen reportador *GAL1::HIS3*, lo que indica que las proteínas SWC6 y ESD1/ARP6 de Arabidopsis son capaces de interactuar en levaduras.

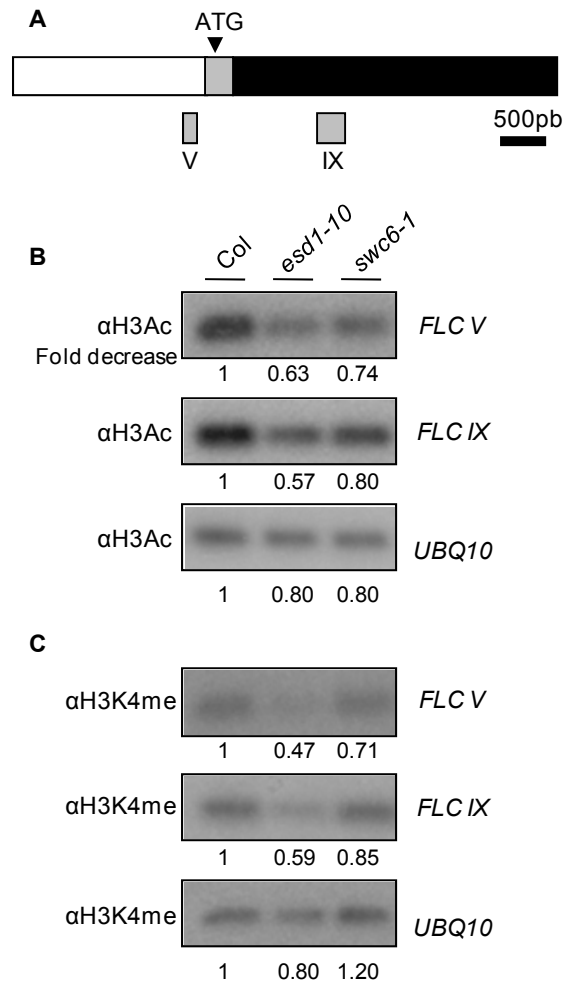


**Fig. 18. Las proteínas SWC6 y ESD1/ARP6 de Arabidopsis interactúan físicamente en levaduras.** Las proteínas completas SWC6 y ESD1/ARP6 fueron fusionadas a los dominios de unión de DNA y de activación de GAL4, respectivamente. Estas construcciones y combinaciones de las mismas con los vectores vacíos (pGBT8 y pGAD) se transformaron en levaduras y crecieron en medio no selectivo (SC -L, -W) o en medio selectivo (SC -L, -W, -H), en concentraciones crecientes de 3-AT (0, 5, 10 y 20 mM). Se cultivaron diluciones crecientes de izquierda a derecha, en cada placa.

### 1.7. SWC6 es necesario para la activación de la transcripción de *FLC* a través de mecanismos de acetilación y metilación de histonas

La expresión del gen *FLC* integra señales de diferentes rutas implicadas en la regulación de la transición floral (He, 2012). Diversos estudios han demostrado el papel de las modificaciones epigenéticas en la regulación de la expresión de *FLC* a través de *FRI*, y las rutas autónoma, de vernalización y mediante la acción de los complejos SWR1 y PAF1 (Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008; Choi et al., 2011; Andrés y Coupland, 2012). Estos resultados han permitido identificar al primer intrón de *FLC* como una región relevante en la regulación transcripcional de este locus, que es sometida a la modificación de histonas (Heo y Sung, 2011; Andrés y Coupland, 2012; He, 2012). Ya que la mutación *swc6-1* es epistática sobre *fve-3*, suprimiendo el fenotipo de floración tardía de estos mutantes de la ruta autónoma y puesto que *FVE/AtMSI4* reprime la transcripción de *FLC* a través de mecanismos de deacetilación de histonas, SWC6 podría estar implicado en la acetilación de histonas, necesaria para activar la expresión de *FLC* y por ello decidimos realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos frente a histona H3 acetilada en las lisinas 9 y 14 (Fig. 19). De hecho, se ha demostrado previamente que ESD1/ARP6, es necesario para el establecimiento de estas marcas epigenéticas en la cromatina de *FLC* (Martín-Trillo et al., 2006). La cromatina de plantas Col, *esd1-10* y *swc6-1* fue inmunoprecipitada utilizando anticuerpos contra la histona H3 acetilada. Usando como molde estos DNAs de la cromatina precipitada, se amplificaron dos fragmentos genómicos que contienen regiones del promotor y del primer intrón de *FLC* (Fig. 19A). Estas sondas se

seleccionaron entre aquellas que mayores diferencias de expresión mostraron en experimentos previos con cromatina inmunoprecipitada de mutantes *esd1-10* (Martín-Trillo et al., 2006). Para las sondas ensayadas, las secuencias amplificadas de *FLC* fueron más abundantes en el DNA precipitado de la cromatina de Col que en el de la cromatina de las plantas mutantes *swc6-1* y *esd1-10* (Fig. 19B), indicando que ambas proteínas, SWC6 y ESD1/ARP6, afectan a los niveles de acetilación de H3 en la cromatina de *FLC*. De esta manera se puede concluir que ambas proteínas son necesarias para la activación de la expresión de *FLC* mediante mecanismos que implican la acetilación de histonas en su cromatina. En paralelo, hemos analizado el posible efecto de SWC6 sobre la metilación de histonas en el locus *FLC*, tal y como se demostró previamente para ESD1/ARP6 (Martín-Trillo et al., 2006). Se ha observado que la hipermetilación de H3K4 está asociada con la transcripción activa de la cromatina de *FLC* (Rando, 2007; Xu et al., 2008), y nosotros nos preguntamos si SWC6 podría participar en el establecimiento de estas marcas epigenéticas en la cromatina de *FLC*. Siguiendo aproximaciones similares a las descritas para la inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos  $\alpha$ H3Ac, hemos demostrado que los niveles de trimetilación de H3K4 para las sondas de *FLC* ensayadas fueron más bajas en las plantas mutantes *swc6-1* y *esd1-10* en comparación con las plantas silvestres (Fig. 19C), indicando que SWC6 se requiere también para el establecimiento de la marca H3K4me3 en la cromatina de *FLC*. Si bien en fondo genético mutante *swc6-1*, nosotros hemos observado un descenso tanto en la acetilación de histona H3 como en la trimetilación de H3K4, estos efectos fueron siempre menos pronunciados que los observados en los mutantes *esd1-10*, lo que sugiere una mayor implicación de ESD1/ARP6 en el establecimiento de estas modificaciones en la cromatina de *FLC*, en comparación con SWC6.



**Fig. 19. Efectos de la mutación *esd1-10* y *swc6-1* en la acetilación y metilación de histonas de la región genómica de *FLC* mediante análisis de ChIP.** (A) Región genómica de *FLC* analizada mediante ChIP. La caja blanca corresponde a la región del promotor de *FLC*, las cajas grises corresponde a los exones y la caja negra, al primer intrón. Los dos fragmentos genómicos analizados por PCR semicuantitativa están representados y numerados. (B) Productos de PCR después de 25 ciclos de amplificación para plantas Col, mutantes *esd1-10* y *swc6-1* usando como molde DNA purificado de cromatina inmunoprecipitada con anticuerpos contra H3 acetilada en K9 y K14 ( $\alpha$ H3Ac). Se muestra el descenso en la acetilación de H3 de los mutantes *swc6-1* y *esd1-10* comparados con Col. (C) Productos de PCR después de 25 ciclos de amplificación, de plantas Col, mutantes *esd1-10* y *swc6-1* como en (B) pero usando como molde un DNA purificado de la cromatina inmunoprecipitada mediante anticuerpos contra la trimetilación de H3K4 ( $\alpha$ H3K4me). Se muestra el descenso en la metilación de H3K4 de los mutantes frente al ecotipo silvestre. Los datos proporcionados son representativos y se han tomado de uno de los tres experimentos realizados. El gen de *UBQ10* se amplificó durante 22 ciclos y se utilizó como control para la cuantificación del DNA.

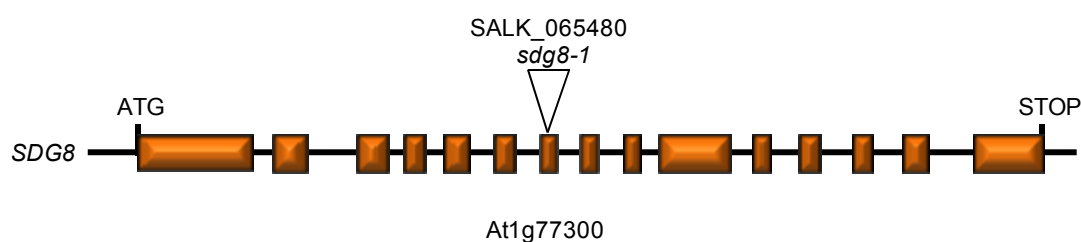
### 1.8. Interacción genética de *SWC6* y *SDG8/EFS*, que codifica una metiltransferasa de histonas reclutada por el Complejo PAF1

Como ya se ha mencionado, los mutantes de pérdida de función *pie1*, *swc6-1* y *esd1-10*, suprimen el fenotipo de floración tardía presente en las líneas que contienen un alelo *FRI* activo y en mutantes de genes que intervienen en la ruta autónoma, debido principalmente a una reducción en los niveles de expresión de *FLC* (Choi et al., 2005, 2007, Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008; March-Díaz y Reyes, 2008). Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina han demostrado que PIE1 y ESD1/ARP6 son necesarios para la introducción de H2A.Z en los sitios de iniciación y terminación de la transcripción de los genes *FLC*, *MAF4* y *MAF5* (Deal et al., 2007) y que estas proteínas junto con SWC6 son necesarias para el mantenimiento de elevados niveles de acetilación de H3 y metilación de H3K4 de la cromatina de *FLC* (Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008).

En *Arabidopsis*, se ha sugerido que los complejos SWR1 y PAF1 podrían participar conjuntamente en la regulación transcripcional como ocurre en levaduras (Krogan et al., 2002). Por su parte el PAF1-C durante la iniciación de la transcripción orquesta el reclutamiento de múltiples modificadores de la cromatina, entre lo que se encuentra la metiltransferasa de H3K36, SDG8 componente del complejo COMPASS (Farrona et al., 2008). En *Arabidopsis*, los mutantes de pérdida de función de *SDG8/EFS* presentan un fenotipo de floración temprana y se ha demostrado que la proteína SDG8/EFS es necesaria para la introducción de las marcas H3K36me<sub>2/3</sub> y participa en la activación de la expresión de *FLC* y de los genes *MAFs* (Xu et al., 2008). También se ha demostrado que SDG8/EFS posee una doble función sobre la activación de *FLC*, ya que además de actuar como metiltransferasa de histonas, recluta un complejo activador que contiene a *FRI* (Ko et al., 2010; Choi et al., 2011). Por tanto, al igual que ocurre con el SWR1-C, el PAF1-C y la proteína SDG8/EFS, son necesarios para el mantenimiento de elevados niveles de determinadas marcas epigenéticas en la cromatina de *FLC* (Krogan et al., 2003; Xu et al., 2008). Estudios realizados recientemente, mediante ensayos de doble híbrido, revelan la existencia de una interacción física de SWC6 con las proteínas FLX y SUF4, componentes del complejo *FRI* (*FRI-C*) (Choi et al., 2011). Además, mediante ensayos BiFC, se ha observado que SWC6 interactuaba físicamente con SDG8/EFS (Choi et al., 2011). Todos estos datos sugieren que SWC6 juega un papel clave en la coordinación de los complejos SWR1, *FRI* y de SDG8/EFS (Ko et al., 2010; Choi et al., 2011). Por ello, decidimos estudiar la posible interacción genética entre *SWC6* y *SDG8/EFS* en el control del tiempo de

floración y otros procesos del desarrollo, generando plantas mutantes para ambos genes.

En *Arabidopsis* se ha identificado un gen ortólogo a *SDG8/EFS* de levaduras, At1g77300, que contiene 15 exones y codifica una proteína de 1759 aminoácidos, que muestra una elevada homología con la proteína SET2 de levaduras y presenta un dominio SET en su extremo carboxilo-terminal y un dominio CW en su extremo amino-terminal que reconoce diferentes estados metilados de H3K4 (Hoppmann et al., 2011).

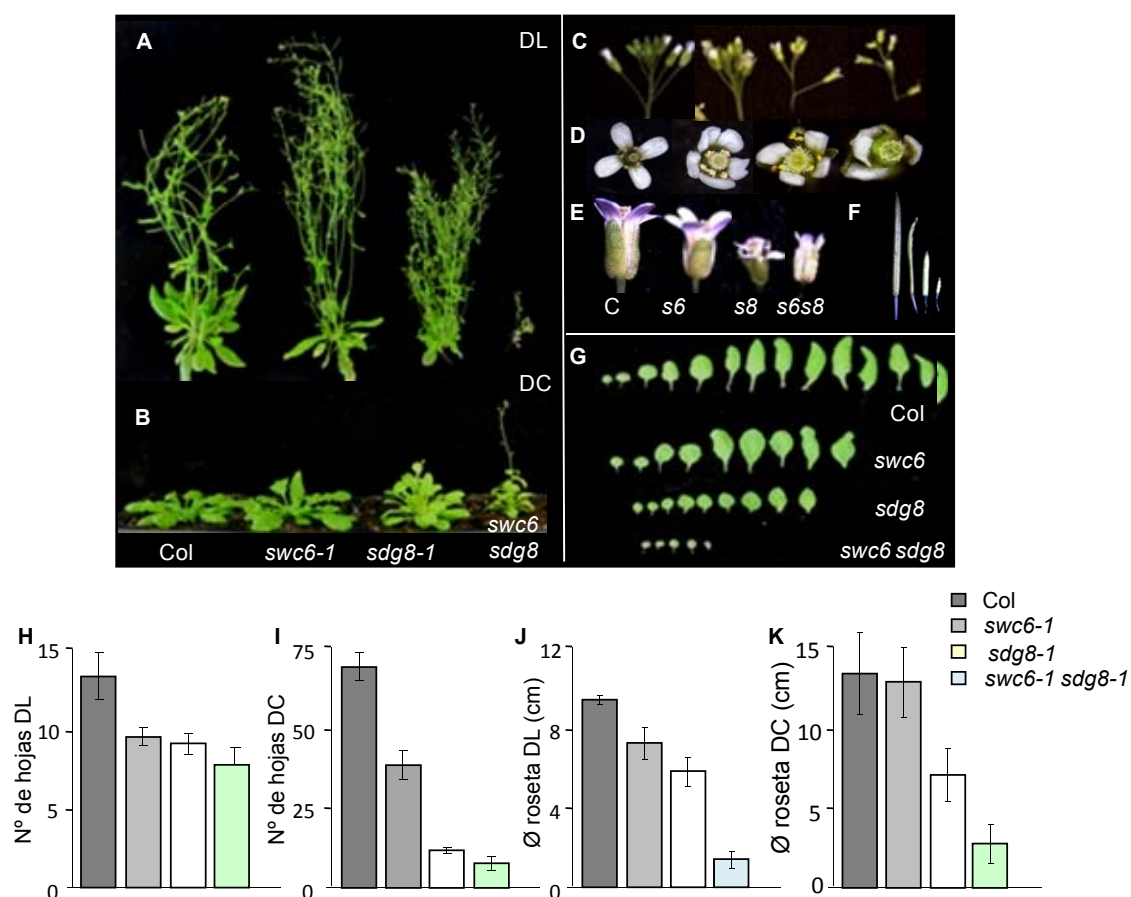


**Fig. 20. Representación esquemática de la estructura génica de *SDG8/EFS* y localización de la inserción de T-DNA en el alelo *sdg8-1*.** Las cajas naranjas representan los exones, la línea negra los intrones y regiones 5' y 3'UTR del gen. El triángulo invertido representa la inserción que da lugar a la mutación *sdg8-1*.

Para estudiar la posible interacción genética de *SDG8/EFS* y *SWC6* en el control de la transición floral, caracterizamos una línea de inserción de T-DNA, SALK\_065480, denominada *sdg8-1*, que presenta una inserción en el séptimo exón (Zhao et al., 2005) (Fig. 20). Esta mutación es recesiva y plantas homocigotas para *sdg8-1* presentan un fenotipo muy pleiotrópico. Los mutantes *sdg8-1* muestran una aceleración en el tiempo de floración tanto en DL como en DC (Tabla 10), una desaceleración del crecimiento de la roseta y una reducción en el tamaño de los órganos. Adicionalmente, observaciones realizadas por otros grupos indican que el mutante *sdg8-1* presenta un gran aumento de la ramificación de las raíces, alteración de la fertilidad y de la composición de carotenos y además, manifiesta daños en la defensa de la planta frente al ataque de patógenos (Kim et al., 2005; Xu et al., 2008; Cazzonelli et al., 2009; Berr et al., 2011). Por otra parte, los estudios realizados sobre la expresión de algunos genes de floración son consistentes con este fenotipo, ya que en estos mutantes disminuye la expresión de *FLC* y aumenta la expresión de *FT* y *SOC1* (Zhao et al., 2005).

Cuando analizamos el fenotipo del doble mutante *swc6-1 sdg8-1*, observamos que este es más temprano que los mutantes parentales sencillos, tanto en DL como en DC (Fig. 21A y B. Tabla 10), produciendo en ambos casos el mismo número de hojas, lo

que sugiere que la respuesta de floración de estas plantas es insensible al fotoperiodo. Las plantas *swc6-1 sdg8-1* también presentan otras alteraciones del fenotipo, como una disminución drástica en el tamaño en general, un aumento del número de meristemas de ramificación y un menor tamaño de las flores (Fig. 21A-E). Las hojas de roseta presentan una fuerte reducción en su tamaño, al igual que la longitud de las silicuas, que es mucho más reducida en los dobles mutantes comparado con la planta silvestre o los parentales sencillos (Fig. 21F y G).



**Fig. 21. Interacción genética entre los loci *SWC6* y *SDG8/EFS* en el control de la floración.** (A) Fenotipo de floración de plantas Col, *swc6-1*, *sdg8-1* y el doble mutante *swc6-1 sdg8-1* cultivadas en condiciones de fotoperiodo de DL durante 26 días y (B) en DC durante 62 días. (C) Defectos pleiotrópicos en órganos vegetativos y reproductivos observados en el doble mutante *swc6-1 sdg8-1*. Fotografía de inflorescencia de plantas Col, *swc6-1*, *sdg8-1* y doble mutante *swc6-1 sdg8-1*. (D) Disposición de los pétalos en las flores de los distintos genotipos. (E) Tamaño de flores de los distintos genotipos. (F) Defectos en el tamaño de las silicuas. (G) Hojas de roseta y caulinares de Col, *swc6-1*, *sdg8-1* y *swc6-1 sdg8-1* cultivadas en condiciones de DL. Todas las hojas, incluidos los cotiledones, se presentan en orden de producción. (H) Representación gráfica del número de hojas total producidas en DL, e (I) en DC, de los distintos genotipos. (J) Gráfica representativa del diámetro de la roseta medido en cm, de los distintos genotipos tanto en DL, como en DC, (K).

Estas observaciones demuestran la existencia de un efecto aditivo de las mutaciones *swc6-1* y *sdg8-1* sobre el fenotipo de floración temprana, consistente con el posible reclutamiento por parte del FRI-C, de los distintos complejos remodeladores de cromatina presentes en *Arabidopsis* como SWR1-C y PAF1-C, implicados en la regulación de la expresión de *FLC* y de genes de la familia *MAF*, que intervienen en el control de la transición floral (Choi et al., 2011).

Por tanto, la caracterización funcional de *SWC6* en *Arabidopsis* nos permite concluir que este gen funciona como un represor floral, ya que la pérdida de función de *SWC6* origina un fenotipo de floración temprana, regulando la expresión de los genes *FLC*, *MAF4* y *MAF5*. Además, *SWC6* interacciona físicamente con ESD1/ARP6 y ambas proteínas son necesarias para mantener los niveles de acetilación de H3 y de trimetilación de H3K4 requeridos para una elevada expresión de *FLC*. Por otro lado, *SWC6* interacciona tanto física como genéticamente con *SDG8/EFS* en la regulación del tiempo de floración. Sin embargo, aún no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales ambas proteínas cooperan en el control de diferentes procesos del desarrollo en *Arabidopsis*, como la represión floral. Todas estas observaciones indican que *SWC6* podría formar parte de un complejo molecular en *Arabidopsis* relacionado con los complejos SWR1/SRCAP identificados en otros eucariotas, que podría regular diversos aspectos del desarrollo de las plantas, incluyendo la transición floral.



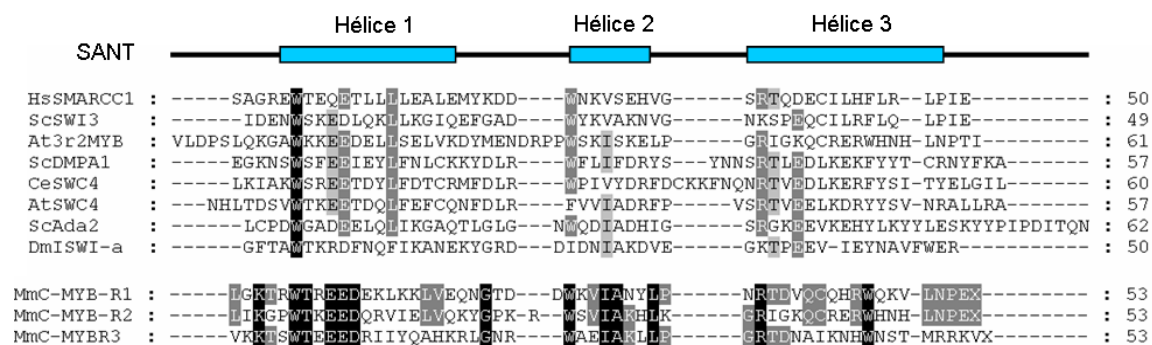
## 2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *SWC4* DE ARABIDOPSIS

### 2.1. Caracterización genética y molecular de *SWC4* en Arabidopsis

Una vez completada la caracterización genética y funcional del locus, *SWC6*, nos propusimos profundizar en el papel que desempeña el SWR1-C en el control de la floración y en su posible interdependencia funcional con NuA4-C, mediante el estudio del ortólogo en Arabidopsis de la subunidad Swc4/Eaf2 de levaduras (Tabla 1). Para ello, hemos abordado la caracterización funcional del gen At2g47210, que denominados *SWC4*, con el propósito de comprobar si desempeña funciones similares a otras subunidades ya descritas para el SWR1-C de Arabidopsis y determinar si participa en la regulación de la transición floral.

En Arabidopsis, la proteína homóloga *SWC4* se encuentra codificada por un gen único (At2g47210) formado por 16 exones. Esta proteína, compuesta por 441 aminoácidos, contiene un dominio SANT característico, en su extremo amino terminal (Aasland et al., 1996; Auger et al., 2008), y un dominio DMAP1 (DNA Methyltransferase-Associated Protein 1) en su extremo carboxilo-terminal (Lee et al., 2010a) (Fig. 22 y 23). El dominio SANT se caracteriza por contener 3 alpha-hélices y adoptar una conformación muy similar a la que muestra el dominio Myb de unión a DNA (Williams y Grotewold, 1997; Boyer et al., 2004; Jiang et al., 2004), por lo que se ha propuesto que la proteína *SWC4* pudiera unirse al DNA (Fig. 22).

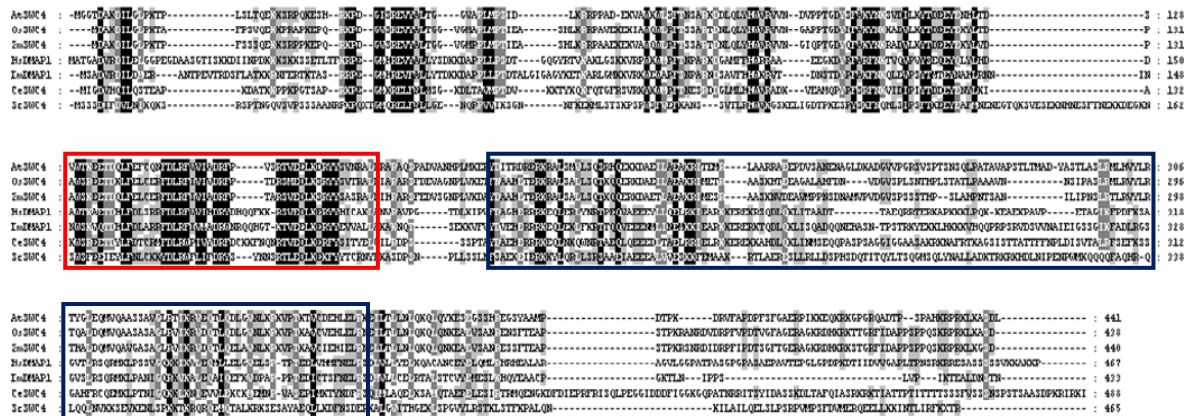
El dominio SANT constituye una región muy conservada que se encuentra en múltiples proteínas que participan en complejos remodeladores de cromatina y se ha implicado en la interacción con histonas, al igual que con otras proteínas de carácter básico (Boyer et al., 2004). Este dominio también se encuentra presente en la proteína Eaf1, una subunidad del NuA4-C de levaduras, que junto con la subunidad Swc4/Eaf2 desempeñan un importante papel en la regulación génica, en la progresión del ciclo celular y en la reparación de daños en el DNA (Auger et al., 2008). Por otro lado, en levaduras se ha comprobado que solo la región de Swc4/Eaf2 que contiene el dominio SANT es esencial para la viabilidad, concretamente los primeros 269 aminoácidos de los 476 que componen la proteína completa en este organismo (Auger et al., 2008; Micialkiewicz y Chelstowska, 2008) (Fig. 22).



**Fig. 22. El dominio SANT presente en la proteína SWC4 de Arabidopsis está muy conservado y muestra una importante similitud conformacional con el dominio Myb de unión a DNA.** Comparación de la secuencia del dominio SANT de SWC4 con el dominio SANT de las proteínas donde se describió inicialmente (SWI3, ADA2, N-CoR y TFIIB), en diferentes organismos: *Hs*, *Homo sapiens*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *At*, *Arabidopsis thaliana*; *Ce*, *Caenorhabditis elegans*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Mm*, *Mus musculus*, y con el dominio Myb (tipo R1, R2 y R3) de diferentes proteínas. Para el alineamiento se utilizó el programa ClustalX v1.81 (Thompson et al., 1997). Los residuos de aminoácidos marcados en negro indican que son idénticos en todas las secuencias alineadas y en gris se observan los aminoácidos que se conservan en algunas de las secuencias proteicas.

En humanos se ha descrito la proteína DMAP1, que presenta una gran homología con Swc4/Eaf2 (Auger et al., 2008) (Tabla 1). Esta proteína forma parte del SRCAP-C y participa en el mantenimiento global de la metilación de DNA a través de la activación de la enzima DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) (Rountree et al., 2000; Cai et al., 2005; Auger et al., 2008; Lee et al., 2010a). Además, se ha demostrado que la proteína DMAP1 de humanos participa en importantes procesos de la maquinaria celular básica, como el mantenimiento del estado metilado del DNA, la reparación del DNA y el control del ciclo celular (Negishi et al., 2009; Lee et al., 2010a).

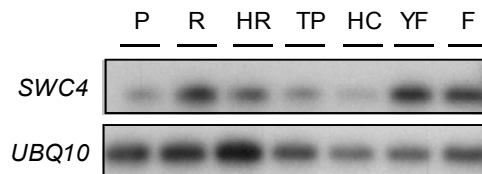
Dada la relevancia de dichos procesos para una correcta funcionalidad de la célula, nos propusimos estudiar en nuestro laboratorio, si el gen *SWC4* de Arabidopsis, también interviene en el control de diferentes procesos celulares, esenciales para un adecuado desarrollo de la planta. De igual manera, dado nuestro interés por el control genético de la transición floral, nos propusimos determinar si *SWC4* participaba en la regulación transcripcional de genes implicados en el control de la floración.



**Fig. 23. La proteína SWC4 contiene un dominio SANT y un dominio DMAP1, característicos.** Comparación de la secuencia proteica de AtSWC4 (*At, Arabidopsis thaliana*) con posibles ortólogos en arroz (*Os, Oryza sativa*), maíz (*Zm, Zea mays*), humanos (*Hs, Homo sapiens*), moscas (*Dm, Drosophila melanogaster*), gusanos (*Ce, Caenorhabditis elegans*), y levaduras (*Sc, Saccharomyces cerevisiae*). Los residuos de aminoácidos marcados en negro indican que son idénticos en todas las secuencias alineadas y en gris, aquellos que están conservados en algunas de las proteínas alineadas. La región contenida en la caja roja corresponde al dominio SANT, mientras que la caja azul contiene al dominio DMAP1.

## 2.2. Análisis del patrón de expresión de SWC4

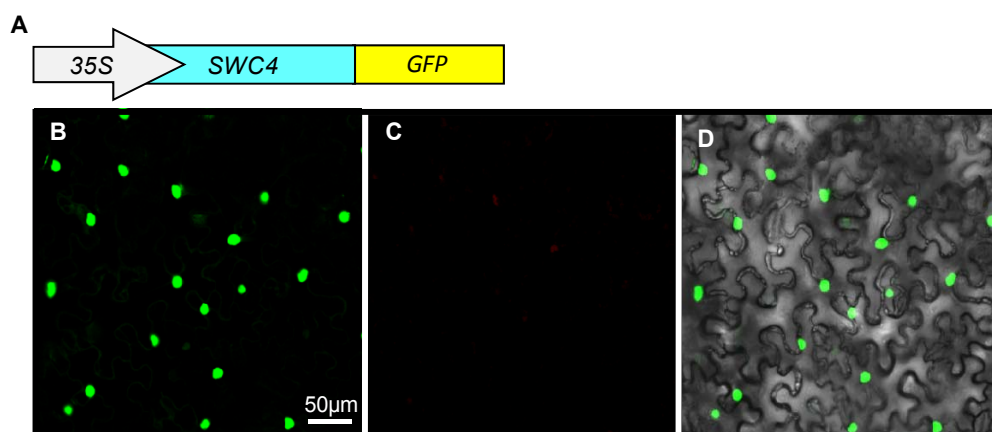
Para abordar el estudio de la expresión de SWC4 en la planta de Arabidopsis, llevamos a cabo la preparación de cDNA a partir de RNA extraído de diferentes órganos como raíces, hojas de roseta y caulinares, tallo principal, yemas florales y flores, o de plántulas completas de Col (Fig. 24). Mediante experimentos de RT-PCR semicuantitativa pudimos observar que el transcrito de SWC4 se expresa en todos los órganos analizados, aunque a distintos niveles. Así, SWC4 presenta mayores niveles de expresión en raíces, yemas florales y flores, coincidiendo con el patrón de expresión observado para el gen SWC6 (Fig. 8 y 24).



**Fig. 24. Expresión de SWC4 en distintos órganos de plantas de Arabidopsis.** Los ensayos de RT-PCR semicuantitativa fueron realizados a partir de RNA extraído de P, plántula completa y de diferentes órganos: R, raíces; HR, hojas de roseta; TP, tallo principal; HC, hojas caulinares; YF, yemas florales y F, flores de plantas Col cultivadas durante 25 días en condiciones de DL. Los productos resultantes de la reacción de RT-PCR se hibridaron con una sonda específica del gen SWC4. Se utilizó la expresión de UBQ10 como control de carga.

Con el fin de determinar si hay diferencias de expresión de *SWC4* en los distintos tejidos, generamos plantas transgénicas en fondo Col con una fusión transcripcional de 891pb de la región promotora de *SWC4* con el gen delator *GUS*. Después del análisis de más de 10 líneas homocigotas independientes, portadoras de dicha construcción, en distintos estadios del desarrollo de la planta, desafortunadamente, no obtuvimos ningún resultado que nos revelara la localización de la expresión de *GUS* en ningún tejido. Esto nos sugiere que la secuencia genómica elegida no era suficiente para conferir un patrón de expresión del gen reportador similar al del gen endógeno *SWC4*.

En diversos estudios se ha comprobado que las proteínas homólogas de *SWC4* en otros organismos como levaduras, humanos o *Drosophila*, constituyen subunidades que forman parte de complejos de remodelación de cromatina localizados en el núcleo celular (Doyon y Côté, 2004; Auger et al., 2008; Zhou et al., 2010). Con el fin de determinar la localización subcelular de *SWC4*, generamos una construcción del cDNA de *SWC4* con el gen *GFP* fusionado por su extremo carboxilo terminal, dirigida por el promotor 35S (Assaad y Signer, 1990) (Fig. 25A). Utilizamos esta construcción para agroinfiltrar plantas de *N. benthamiana* y expresar de forma transitoria la proteína de fusión *SWC4-GFP*, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Mediante microscopía confocal, analizamos las células epidérmicas de la cara abaxial de las hojas de *Nicotiana* y observamos que la proteína *SWC4-GFP* se localiza preferentemente en el núcleo de dichas células (Fig. 25).

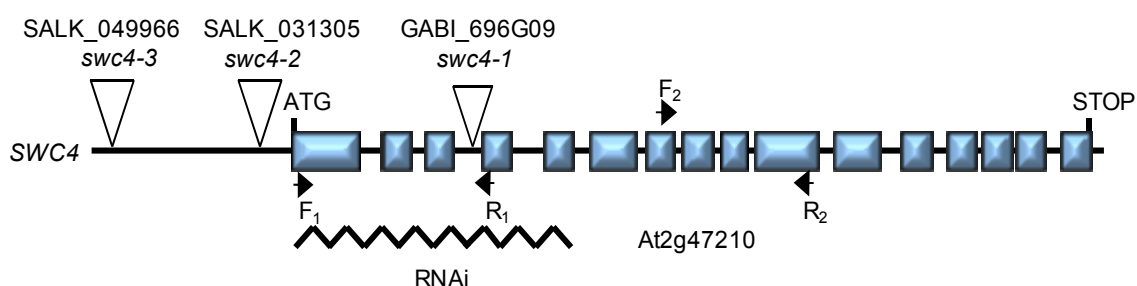


**Fig. 25. Localización subcelular de la proteína *SWC4* fusionada a *GFP* en plantas de *N. benthamiana*.** (A) Esquema de la construcción 35S::*SWC4-GFP* introducida en plantas de *Nicotiana*. (B) Imagen de la cara abaxial de una hoja de *Nicotiana* donde se observa la expresión de la construcción 35S::*SWC4-GFP* en el núcleo de las células epidérmicas. (C) Imagen de la autofluorescencia emitida por la clorofila de la misma sección de la hoja. (D) Superposición de ambas imágenes B y C, con la imagen óptica de la misma sección de la hoja de *Nicotiana*. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomadas con un microscopio modelo Leica SP2, de las hojas agroinfiltradas de *Nicotiana*. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Leica LCS Lite.

Por tanto, estos resultados nos permiten concluir que *SWC4* se expresa en todos los órganos de *Arabidopsis* analizados y que la proteína de fusión *SWC4-GFP* se localiza preferentemente en el núcleo de las células epidérmicas de plantas de *Nicotiana agroinfiltradas*. Estos datos indican que *SWC4* es una proteína nuclear, lo que es consistente con su posible participación en complejos remodeladores de cromatina como *SWR1-C* y *NuA4-C* en *Arabidopsis*, al igual que se ha descrito en otras especies de eucariotas.

### 2.3. La pérdida total de función de *SWC4* provoca letalidad en plantas de *Arabidopsis*

Para investigar el posible papel que desempeña el gen *SWC4* en el control de diversos procesos del desarrollo en *Arabidopsis* y más concretamente en la floración, hemos identificado, a partir de las colecciones públicas, tres líneas portadoras de inserciones de T-DNA en la región genómica de *SWC4*, GABI\_696GD9, SALK\_031305 y SALK\_049966, que hemos designado como *swc4-1*, *swc4-2* y *swc4-3*, respectivamente (Fig. 26).



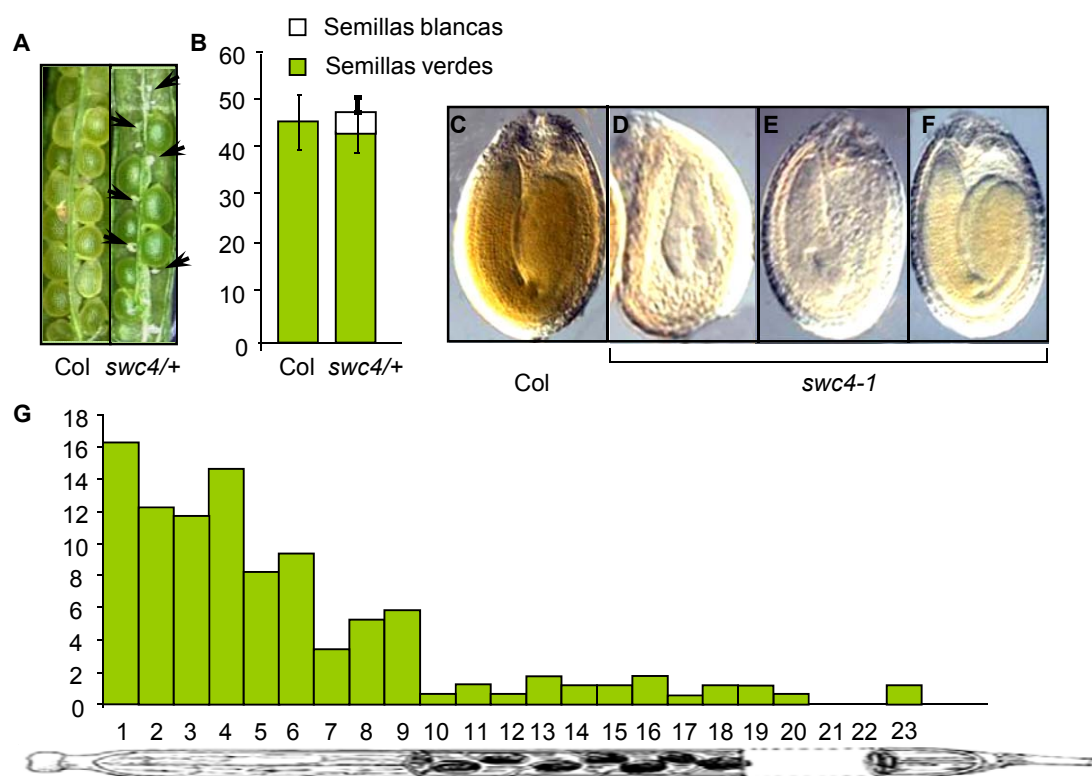
**Fig. 26. Esquema de la estructura génica de *SWC4* y localización de las inserciones de T-DNA en las líneas seleccionadas.** Las cajas azules representan los exones del gen, la línea negra corresponde a los intrones y regiones 5' y 3'UTR. Los triángulos invertidos representan las inserciones que dan lugar a las mutaciones *swc4-1*, *swc4-2* y *swc4-3*. La línea en zig-zag corresponde a la zona utilizada del RNA mensajero de *SWC4*, para generar las líneas silenciadas *swc4i*, mediante RNA interferente. Las flechas hacen referencia a los cebadores directos ( $F_1/F_2$ ) y reversos ( $R_1/R_2$ ) utilizados para generar las sondas empleadas en el análisis de la expresión de *SWC4* mediante experimentos de RT-PCR (Tabla 8).

La línea GABI\_696GD9 (*swc4-1*) presenta una inserción de T-DNA en el tercer intrón del locus At2g47210, concretamente en la posición correspondiente al nucleótido 487 de la secuencia genómica, desde el codón de iniciación ATG (Fig. 26). Una vez identificada una planta heterocigota *swc4/+*, portadora de dicha inserción, ésta fue autofecundada con el fin de aislar plantas homocigotas para dicha mutación en la siguiente generación. Sin embargo, el análisis de más de 50 plantas descendientes de

plantas heterocigotas, no permitió aislar plantas portadoras del alelo mutante en homocigosis. Esto nos llevó a plantear la posibilidad de que las plantas homocigotas no fuesen viables, y que la mutación *swc4-1* en homocigosis confiriese letalidad a nivel embrionario. De hecho, cuando observamos en detalle una sección longitudinal de las silicuas resultantes de la autofecundación de las plantas heterocigotas *swc4/+*, pudimos detectar la presencia de semillas abortadas, confirmando la importancia de *SWC4* en el desarrollo del embrión (Fig. 27A). Para corroborar que la mutación *swc4-1* en homocigosis daba lugar a semillas abortadas, provocando la letalidad de estos mutantes, llevamos a cabo diferentes aproximaciones. En primer lugar, sembramos semillas de la línea GABI\_696GD9 en medio selectivo y seleccionamos plantas heterocigotas resistentes a sulfadiazina, resistencia conferida por la inserción de T-DNA. Estas plantas fueron transferidas a tierra y genotipadas mediante aproximaciones de PCR, con cebadores específicos *SWC4* 5' y GABI8760, descritos en la tabla 3, que permiten detectar la inserción de T-DNA presente en dicha línea. A partir de las plantas heterocigotas obtenidas, realizamos un recuento del número total de semillas por silicua y observamos que no existía una diferencia significativa respecto a la planta silvestre (Fig. 27B), si bien determinamos la existencia de dos tipos anormales de semillas (Fig. 27C-F). El primer tipo, contiene embriones no desarrollados y es probable que no llegaran nunca a formar semillas maduras (Fig. 27D, E). El segundo tipo de semillas presentan un embrión maduro pero de color blanco (Fig. 27F). Este último tipo de semillas se recogió de las silicuas antes de completar la desecación y se sembró en medio MS suplementado con giberelinas. Sin embargo, dichas semillas nunca llegaron a germinar, ni tampoco pudimos extraer DNA genómico de ellas, para poder determinar si, efectivamente, correspondían a semillas portadoras de la inserción de T-DNA en homocigosis.

La cuantificación del porcentaje de las semillas decoloradas reveló la presencia de aproximadamente un 10% de las semillas con estas características, por silicua madura de plantas heterocigotas *swc4/+* (Fig. 27B). Dichas semillas decoloradas, junto con las semillas abortadas, se localizan principalmente en la parte superior de la silicua (Fig. 27A y G). La cuantificación del porcentaje de semillas decoloradas, localizadas en una posición determinada de la silicua, desde la posición 1, en la parte superior más próxima al estigma, hasta la posición 23, al final de la silicua, reveló una proporción de semillas blancas en torno al 20% en las primeras posiciones. Por el contrario, en las posiciones más distales, solo se concentraron semillas blancas en un porcentaje menor al 2% (fig. 27G). Estos datos fueron obtenidos en colaboración con el laboratorio de la Dra. Claudia Köhler, del Departamento de Biología Vegetal y Genética Forestal, Uppsala BioCenter,

de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas (*Swedish University of Agricultural Sciences and Linnean Center of Plant Biology*), Uppsala, Suecia.



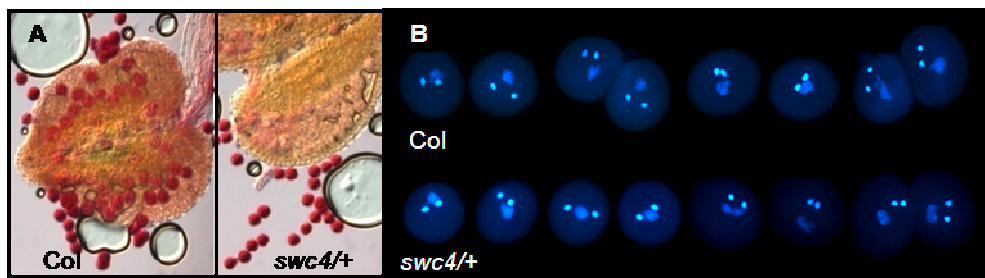
**Fig. 27. Las plantas heterocigotas *swc4/+* presentan anomalías en la formación de las semillas.** (A) Corte longitudinal de una silicua de Col y de una silicua de una planta heterocigota *swc4/+*, cultivadas en condiciones de DL. Imagen tomada de la parte superior de la silicua. (B) Cuantificación del número total de semillas y del número de semillas blancas en heterocigotos *swc4/+* comparado con la planta silvestre. (C-F) Detalle de semillas de Col (C), semillas de plantas *swc4/+*, abortadas, con embrión no desarrollado, decoloradas, que adoptan una forma arrugada (D, E), y semillas maduras, con un embrión desarrollado, pero de color blanco (F). (G) Distribución del porcentaje de semillas blancas a lo largo de una silicua madura, en plantas *swc4/+*. Estas semillas blancas se concentran en mayor proporción en la parte superior de la silicua. La longitud de la silicua se dividió en 23 regiones para determinar la distribución de las semillas blancas en las diferentes posiciones de la misma.

Dado que no se detectaron individuos homocigotos para el alelo mutante *swc4-1*, resultantes de la autofecundación de plantas *swc4/+* y que la proporción de semillas defectuosas en la descendencia de dichas plantas no se ajustó al porcentaje esperado del 25%, decidimos analizar el efecto parental sobre la transmisibilidad del alelo mutante. Para ello realizamos cruces recíprocos de plantas heterocigotas *swc4/+* con plantas silvestres, ya fuesen como parental receptor o como donador del polen, y genotipamos su descendencia. Es importante señalar que solo se obtuvieron plantas *swc4/+* de heterocigotos autofecundados y de cruces donde las plantas *swc4/+* eran



utilizadas como parental receptor. Sin embargo, cuando se usaron plantas *swc4/+* como donadoras de polen, no se detectó ninguna planta con la versión mutada de *SWC4*, en más de 150 plántulas analizadas, lo que indica que el alelo mutante *swc4-1* sólo se puede transmitir por vía materna, cuando el donante de polen es la planta silvestre.

Para comprobar si la mutación *swc4-1* afecta a la viabilidad del polen, realizamos una tinción de Alexander (Alexander, 1969) mediante la cual podemos detectar el polen no abortivo (Fig. 28A). Así, el ácido fucsínico penetra en las células vivas y colorea el citoplasma de rojo, mientras que el polen abortado aparece de color verde, ya que sólo retiene su pared celular, que es teñida con verde de malaquita. También realizamos una tinción con DAPI para analizar el número de núcleos presentes en los granos de polen de plantas heterocigotas *swc4/+* (Fig. 28B). En ningún caso se observaron diferencias con el polen silvestre, lo que indica que el polen procedente de plantas *swc4/+* es viable.

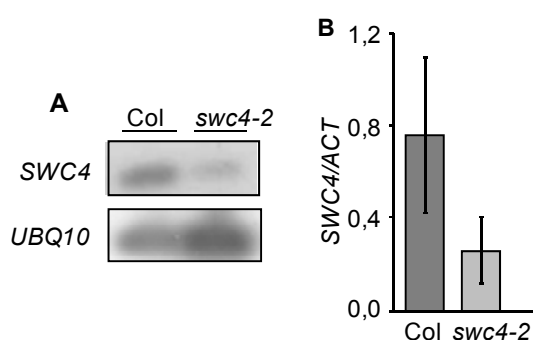


**Fig. 28. La mutación *swc4-1* en heterocigosis no afecta a la viabilidad del polen.** (A) Tinción de Alexander de granos de polen de plantas Col y *swc4/+*. (B) Tinción DAPI de los núcleos de granos de polen de una planta silvestre y heterocigota para *swc4-1*. En ningún caso se observan diferencias significativas de la viabilidad con respecto al polen de la planta silvestre.

Todas estas observaciones indican que, aunque el polen mutante de *sw4-1* se desarrolla, madura y poliniza el estigma adecuadamente, no es capaz de alcanzar los óvulos situados en el centro y en la parte inferior del gineceo para fertilizarlos, debido probablemente, a dificultades en el desarrollo del tubo polínico. Esto explicaría que no se mantenga la proporción del 25% de semillas blancas que se esperaría en la descendencia de una planta heterocigota para el alelo mutante. La fertilización de estos óvulos por el polen mutante, da lugar a semillas blancas o bien a semillas con embriones no desarrollados, que no germinan. Estos datos nos llevan a proponer que la pérdida completa de la función de *SWC4* en *Arabidopsis* conduce a un fenotipo de letalidad embrionaria.

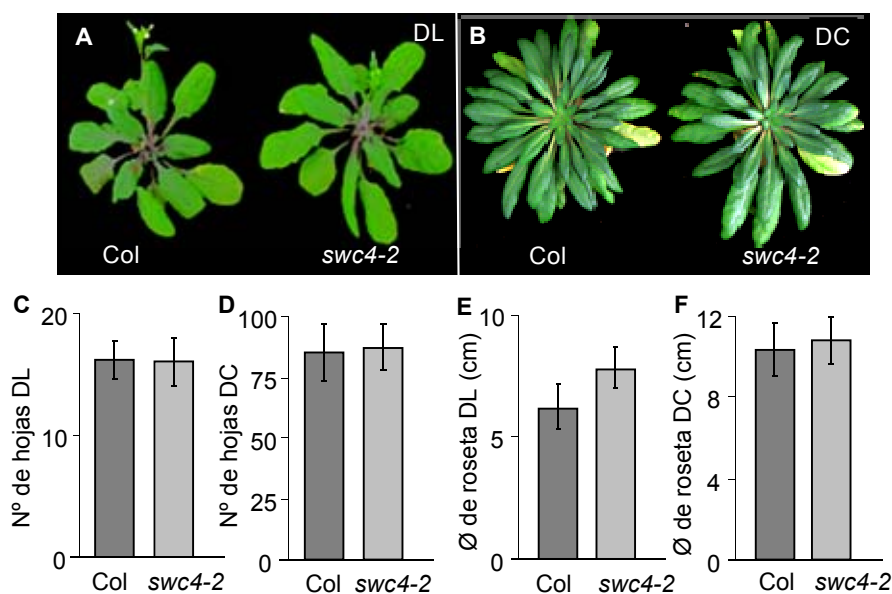


Por este motivo iniciamos el análisis de las líneas SALK\_031305 y SALK\_049966, portadoras de inserciones de T-DNA en el gen *SWC4*, que corresponden a los alelos mutantes *swc4-2* y *swc4-3*, respectivamente. La línea SALK\_031305 presenta una inserción de T-DNA, 185pb por encima del codón de iniciación ATG de *SWC4* (Fig. 26). Una vez seleccionada una línea homocigota para la mutación *swc4-2*, analizamos la expresión de *SWC4* mediante experimentos de RT-PCR y qPCR (Fig. 29). Los resultados indican que el transcrito de *SWC4* se expresa en menor medida en el mutante *swc4-2* respecto a los niveles observados en la planta silvestre, lo que sugiere cierto nivel de silenciamiento del transgén en dicha línea, debido a la inserción del T-DNA en la región reguladora del mismo.



**Fig. 29. Análisis de la expresión de *SWC4* en el alelo mutante *swc4-2*.** (A) Análisis de RT-PCR que muestra una reducción en los niveles de expresión del mRNA de *SWC4* en plantas Col y mutantes *swc4-2* cultivadas bajo condiciones de DL durante 15 días. Usamos como control de carga de este experimento, la expresión del gen *UBQ10*. (B) Expresión de *SWC4* mediante análisis de qPCR, de Col y *swc4-2* cultivadas en DL durante 15 días. Usamos como control, la expresión del gen  $\beta$ -*ACT1*.

A pesar de que los mutantes *swc4-2* presentan una clara reducción en la expresión de *SWC4*, estos no desarrollaron alteraciones fenotípicas visibles ni diferencias significativas en el tiempo de floración respecto a la planta silvestre (Fig. 30), lo que sugiere que la reducción observada en la expresión del gen *SWC4* no es suficiente para comprometer la función de dicho gen, bajo las condiciones experimentales empleadas en nuestros estudios.



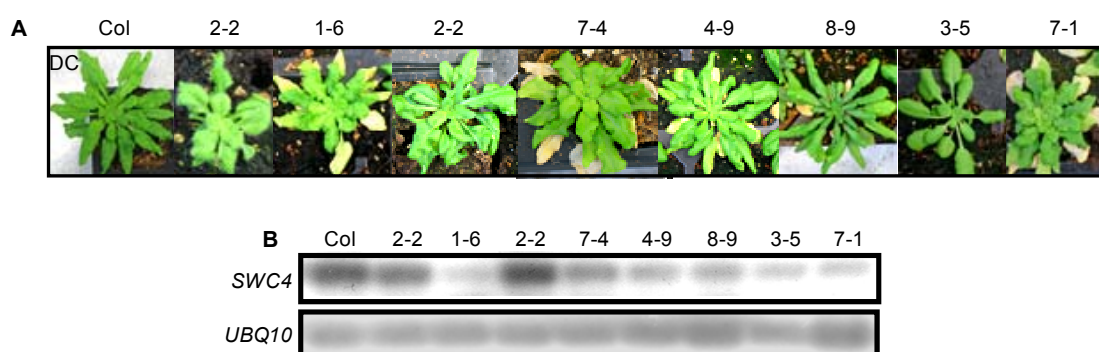
**Fig. 30. Caracterización fenotípica de los mutantes *swc4-2*.** La mutación *swc4-2* no provoca alteraciones del fenotipo. (A) Fenotipo de floración de mutantes *swc4-2* cultivados en condiciones de DL durante 28 días y (B) en DC durante 85 días. (C) Cuantificación del tiempo de floración, según el número de hojas totales de Col y el mutante *swc4-2* en condiciones de DL y (D) en DC. (E) Medida del diámetro de la roseta expresado en cm, de la planta silvestre y *swc4-2* en condiciones de DL y (F) en DC.

Por su parte, la línea SALK\_049966 también contiene una inserción de T-DNA en la región promotora, por encima de la región 5'UTR del gen *SWC4*. Se seleccionaron líneas homocigotas para dicha mutación *swc4-3* y observamos que tampoco estas plantas mutantes presentaban un fenotipo alterado ni cambios en el tiempo de floración. Por lo tanto, se puede concluir que las mutaciones *swc4-2* y *swc4-3* no provocan alteraciones fenotípicas visibles en el desarrollo de dichas plantas, a pesar de que *swc4-2* afecta a los niveles de expresión del transcrito correspondiente. Sin embargo, una inserción de T-DNA en homocigosis en el tercer intrón de *SWC4* conlleva a un fenotipo de letalidad embrionaria, lo que nos permite afirmar que *SWC4* es esencial para el desarrollo embrionario de *Arabidopsis*. Por el contrario, estos alelos mutantes no nos permiten inferir en otras posibles funciones que *SWC4* pueda desempeñar en estadios posteriores del desarrollo de la planta.

#### 2.4. Caracterización fenotípica de plantas con *SWC4* silenciado

Puesto que la mutación de pérdida de función de *SWC4* produce un fenotipo de letalidad embrionaria, decidimos utilizar otras herramientas alternativas que nos permitieran dilucidar el papel que *SWC4* puede desempeñar en diferentes procesos del desarrollo de *Arabidopsis*. Para ello, nos propusimos llevar a cabo una estrategia de

silenciamiento génico parcial, mediante la técnica de *RNA interferente (RNAi)*. Generamos una construcción portadora de un fragmento con las primeras 500pb de la región codificante del gen *SWC4* (Fig. 26), en secuencias repetidas e invertidas, separadas por un intrón, y la clonamos en un vector binario bajo el control del promotor 35S, con el que transformamos plantas Col. Este fragmento de cDNA contiene una región específica del gen *SWC4* que codifica 37 de los 45 aminoácidos que forman el dominio SANT descrito en la proteína *SWC4* de Arabidopsis. Se generaron varias líneas transgénicas *swc4i* independientes y se seleccionaron aquellas que eran portadoras de una única inserción de T-DNA. En la generación T2, la mayoría de estas plantas ya desarrollaban alteraciones fenotípicas visibles y similares entre sí, lo que sugiere que la construcción *swc4i* es funcional y silencia la expresión del gen *SWC4* endógeno (Fig. 31). Seguidamente, se analizó la expresión de *SWC4* en dichas líneas mediante técnicas de RT-PCR semicuantitativa y comprobamos una clara disminución de la expresión del transcrito, si lo comparamos con la expresión de *SWC4* observada en el parental Col sin transformar (Fig. 31B).

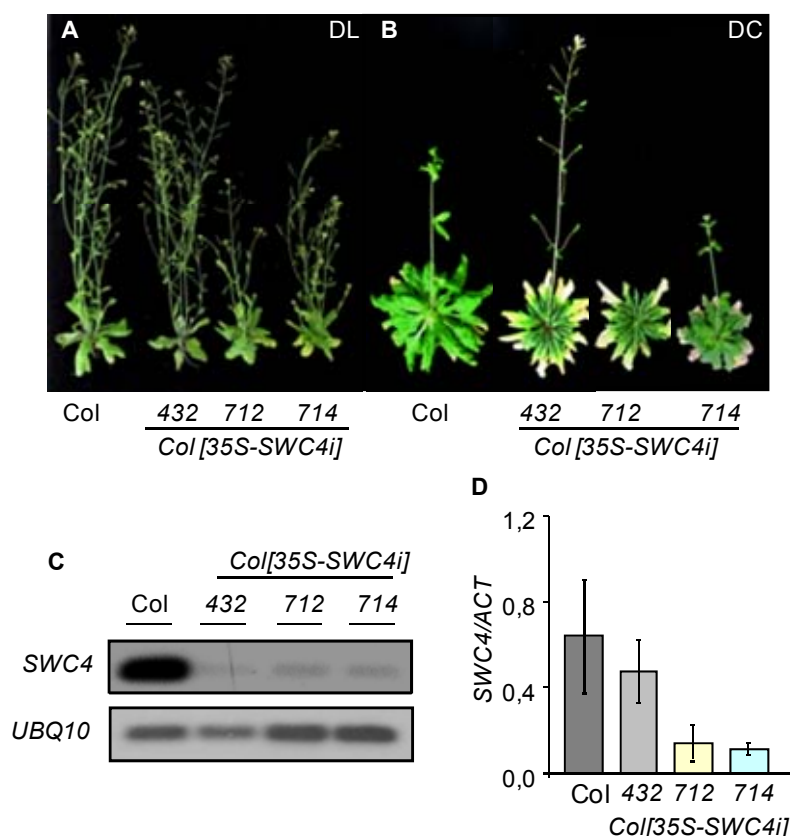


**Fig. 31. Silenciamiento génico de *SWC4* mediante aproximaciones de *RNAi*.** (A) Alteraciones fenotípicas visibles en líneas de la generación T2, de plantas transgénicas Col con una única inserción de la construcción de *RNAi* para *SWC4*, cultivadas en DC. Los números en la parte superior indican las distintas líneas analizadas. (B) Análisis de RT-PCR semicuantitativa que muestra los niveles de expresión del mRNA de *SWC4* en Col y en plantas transgénicas con *SWC4* silenciado, cultivadas en DC. Usamos como control de este experimento la expresión del gen *UBQ10*.

Las líneas que sufrían un silenciamiento claro de la expresión de *SWC4* desarrollaron un fenotipo particular, que mostraba hojas con bordes senescentes, un fuerte rizamiento de las hojas y un menor tamaño de la roseta, características consistentes con una reducción en los niveles de expresión de *SWC4* (Fig.31A).

A continuación, seleccionamos, en la generación T3, líneas transgénicas homocigotas independientes, denominadas *swc4i 432*, *712* y *714*, portadoras de una

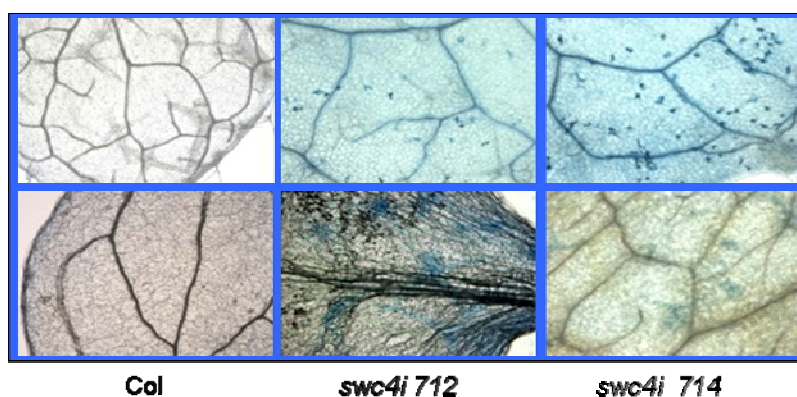
única inserción del transgén, que además se transmitía de forma estable. El análisis de los niveles de expresión de *SWC4* en dichas líneas, mediante experimentos de RT-PCR semicuantitativa y qPCR (Fig. 32C y D), reveló una drástica disminución de su expresión, y dicho descenso coincidía con el grado de severidad de las alteraciones fenotípicas observadas en las diferentes líneas de silenciamiento. La línea *swc4i* 712 fue la que mostró una mayor reducción en los niveles de expresión de *SWC4* así como los defectos fenotípicos más marcados, por lo que decidimos seleccionar esta línea para llevar a cabo su posterior caracterización genética y molecular.



**Fig. 32. Análisis del fenotipo y de la expresión de *SWC4* en líneas transgénicas *swc4i*.** (A) Fenotipo de Col y líneas transgénicas homocigotas independientes, *swc4i* 432, 712 y 714, cultivadas en DL durante 4 semanas y (B) cultivadas en DC durante 13 semanas. (C) Análisis de los niveles de expresión del mRNA de *SWC4* mediante RT-PCR semicuantitativa, en plantas silvestres Col y plantas transgénicas *swc4i*, cultivadas bajo fotoperiodos de DL durante 15 días. Usamos como control de carga de este experimento la expresión del gen *UBQ10*. (D) Análisis de la expresión de *SWC4* mediante qPCR de plantas cultivadas en DL durante 15 días. Usamos como control de este experimento la expresión de  $\beta$ -*ACT1*.

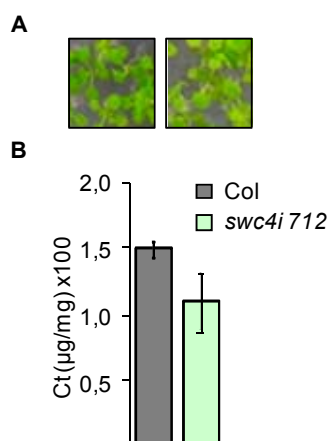
### 2.4.1. Las plantas con *SWC4* silenciado presentan alteraciones pleiotrópicas del fenotipo que afectan a caracteres vegetativos y reproductivos

Entre las alteraciones fenotípicas más visibles que desarrollaron las líneas *swc4i* 712 cultivadas en condiciones de DC, cabe mencionar una aceleración de la senescencia en los bordes de las hojas de la roseta (Fig. 32B). Algunas de estas hojas mostraban un amarilleamiento del color, así como un punteado blanquecino, característico de tejidos necróticos. Esto podría ser la consecuencia de una muerte celular acelerada, un proceso que se ha asociado frecuentemente con la respuesta SAR, de Resistencia Sistémica Adquirida, ya que normalmente, este mecanismo de resistencia va acompañado de una respuesta hipersensible a la infección por patógenos (Greenberg y Yao, 2004). Algunos mutantes de *Arabidopsis* relacionados con el SWR1-C como *hta9 hta11*, *pie1* o *swc6*, muestran una activación constitutiva de la respuesta SAR, desarrollando de forma espontánea lesiones similares a las ocurridas cuando se produce una respuesta de hipersensibilidad, en ausencia de infección (Lorrain et al., 2003; March-Díaz y Reyes, 2009). Con el fin de analizar si las líneas de silenciamiento *swc4i* 712 también desarrollaban una activación de la respuesta SAR, llevamos a cabo una tinción con Trypan Blue, según el protocolo descrito por Rate et al., 1999, para revelar la posible existencia de una muerte celular espontánea en aquellas hojas que presentaban síntomas de amarilleamiento. Mediante este procedimiento pudimos comprobar que efectivamente, las plantas con *SWC4* silenciado también presentaban síntomas de muerte celular, que no se apreciaron en plantas Col (Fig. 33).



**Fig. 33.** Las plantas *swc4i* presentan síntomas de muerte celular acelerada en ausencia de infección por patógenos. Tinción con Trypan Blue de hojas de roseta con síntomas de senescencia de plantas Col, *swc4i* 712 y 714 cultivadas en condiciones de DC (Rate et al., 1999).

Además, observamos que las plantas *swc4i 712* cultivadas en medio MS presentaban un amarilleamiento de las hojas, indicativo de procesos de clorosis (Fig. 34A). Por ello, cuantificamos la cantidad de clorofilas totales (Moran y Porath, 1980), lo que nos permitió confirmar que las plantas silenciadas en *SWC4* contenían aproximadamente un 25% menos de clorofilas que las plantas de tipo silvestre (Fig. 34B), contribuyendo de esta manera a la clorosis observada en *swc4i 712*.

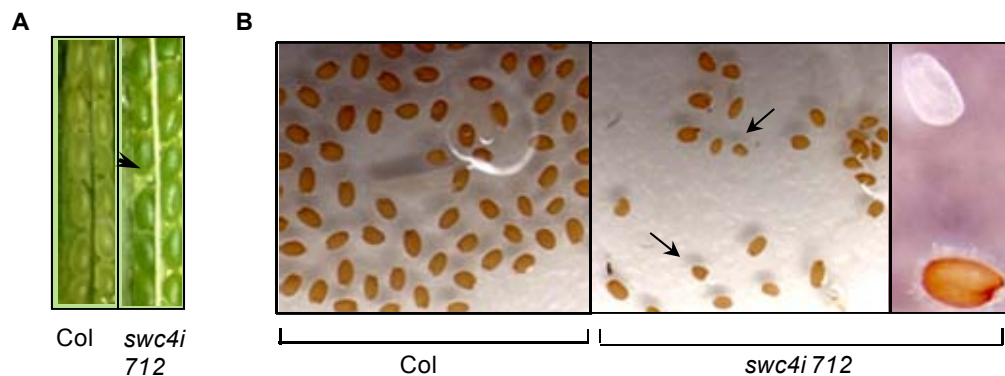


**Fig. 34. Cuantificación de la cantidad de clorofilas totales en plantas *swc4i*.** (A) Imagen de plántulas Col y *swc4i 712* cultivadas en medio MS. (B) Medida de la concentración de clorofilas expresada como µg por mg de tejido, de los distintos genotipos, cultivados en medio MS, en DL durante 9 días.

En estudios realizados por Ascencio-Ibáñez y colaboradores (2008) con plantas infectadas por patógenos, se determinó que dicha infección originaba una reducción de la expresión de los mRNAs que codifican parte del aparato fotosintético, complejos receptores de luz, así como enzimas implicadas en la síntesis de clorofilas. Por tanto, esta reducción en la capacidad fotosintética es una característica de las hojas senescentes (Lim y Nam, 2005; Ascencio-Ibáñez et al., 2008). Según estos hallazgos, las plantas *swc4i 712* que presentan hojas senescentes, con síntomas de muerte celular prematura, también presentan un descenso en la producción de clorofilas totales lo que confirma una respuesta de hipersensibilidad, provocada por el silenciamiento de *SWC4*.

A continuación, cuando sembramos las semillas obtenidas de la línea *swc4i 712* homocigota, observamos que presentaban mayor dificultad para germinar si las comparabamos con las semillas de una planta silvestre (datos no mostrados). En cortes longitudinales de silicuas de *swc4i 712* se observaron algunas semillas abortadas (Fig. 35A) y las semillas obtenidas de esta línea eran además, más pequeñas, irregulares y algunas de color blanco (Fig. 35B). Estas alteraciones presentes en las semillas de *swc4i 712* son consistentes con las observaciones obtenidas previamente en el análisis

de las silicuas de plantas heterocigotas *swc4/+*, donde se encontraron con frecuencia semillas abortadas, y apoyarían la hipótesis de que *SWC4* pudiera estar implicado en el desarrollo del embrión y/o de las semillas (Fig. 27, 35).

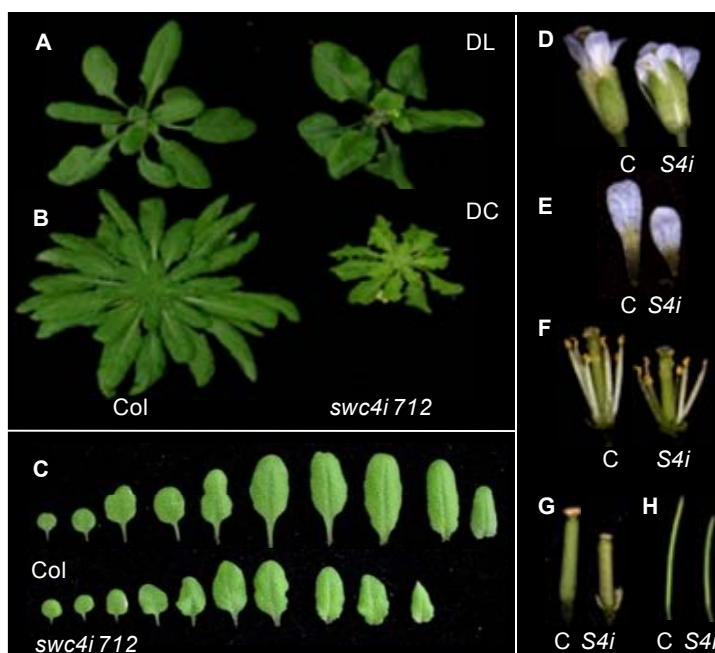


**Fig. 35. Alteraciones en el desarrollo de las semillas producidas por el silenciamiento de *SWC4*.** (A) Corte longitudinal de una silicua madura de plantas Col y *swc4i 712* cultivadas en DL, donde se observan semillas abortadas. (B) Detalle de semillas de Col y de plantas *swc4i 712* donde se observa que las procedentes de *swc4i 712* son de menor tamaño, forma irregular y algunas de color blanco.

Otros aspectos fenotípicos visiblemente alterados en las plantas *swc4i 712* incluyen un menor porte, con un acortamiento de los entrenudos, una reducción en la longitud de la inflorescencia y una débil dominancia apical, tanto en condiciones de DL como en DC (Fig. 32A y B). Igualmente, estas plantas muestran una fuerte reducción del tamaño de la roseta, que se hace más pronunciado en DC (Fig. 36A y B), reduciéndose casi a la mitad respecto a la planta silvestre (38A y D). Las flores de las plantas *swc4i 712* muestran un menor tamaño, con pétalos, estambres y carpelos más pequeños (Fig. 36D-G). Las silicuas de plantas *swc4i 712* también muestran una reducción significativa del tamaño, respecto a Col (Fig. 36H).

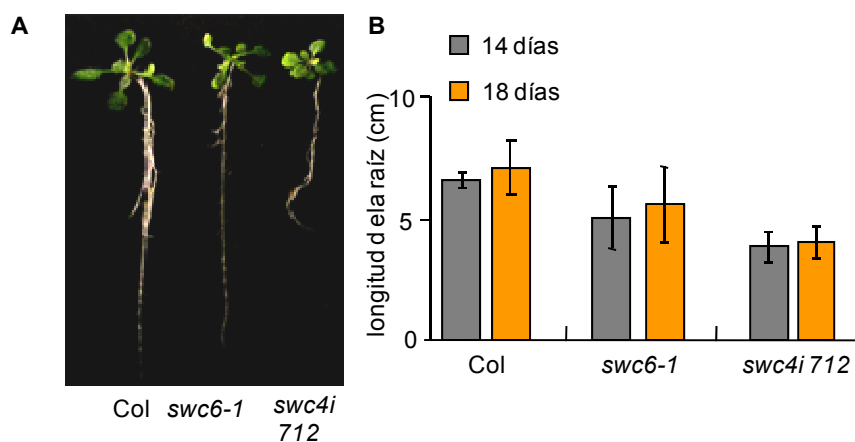
Cuando medimos el tamaño de la raíz principal de plántulas cultivadas bajo condiciones de DL, observamos una menor longitud de ésta, en *swc4i 712* respecto a la planta silvestre (Fig. 37). Por su parte, el mutante *swc6-1* también presenta un acortamiento en la longitud de la raíz principal, si bien no es tan pronunciado como en el caso de *swc4i 712* (Fig. 37).





**Fig. 36. Caracterización fenotípica de plantas transgénicas *swc4i 712*.** (A) Roseta de plantas Col y *swc4i 712* tanto en DL como (B) en DC, cultivadas durante dos y cuatro semanas, respectivamente. (C) Hojas de roseta y primera caulinar de la planta silvestre y *swc4i 712* cultivadas en condiciones de DL. Todas las hojas, incluidos los cotiledones, se presentan en orden de producción. (D) Flores individuales de Col y *swc4i 712* que presentan una disminución en el tamaño general. (E) Pétalos, (F) estambres, (G) carpelos y (H) silicuas, que muestran un tamaño más reducido en plantas *swc4i 712*.

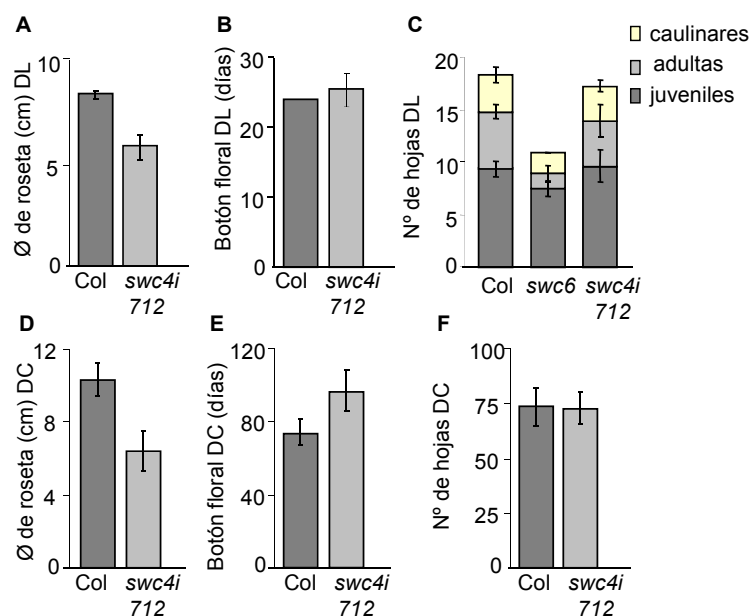
Por lo tanto, el silenciamiento parcial de la expresión de *SWC4* en la línea *swc4i 712* conlleva características fenotípicas muy pleiotrópicas que afectan a diversos aspectos del desarrollo de la planta, ocasionando alteraciones en el tamaño de los distintos órganos tales como hojas de roseta, raíces y flores.



**Fig. 37. Cuantificación de la longitud de la raíz principal en plántulas *swc4i 712*.** (A) Raíces de plántulas cultivadas en medio MS bajo fotoperiodo de DL durante 15 días. (B) Medida de la longitud de la raíz principal (en cm) de plántulas Col, *swc6-1* y *swc4i 712* cultivadas durante 14 y 18 días en medio MS.



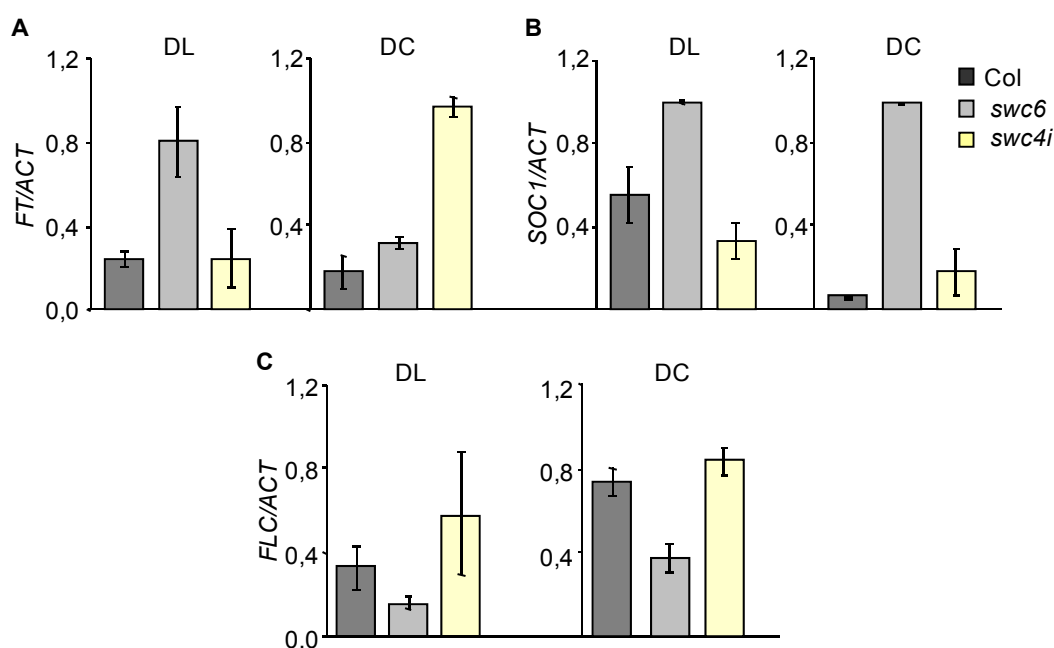
Puesto que el *SWR1-C* se ha implicado en el control de la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo (Lázaro et al., 2008; March-Díaz et al., 2008), decidimos estudiar si las plantas *swc4i 712* presentaban además, alteraciones en el tiempo de floración. Para ello, realizamos cuantificaciones del número total de hojas de roseta y caulinares, en el momento de la aparición del botón floral (Koornneef et al., 1991) o del número de días transcurridos desde la siembra hasta la elongación de 1 mm de longitud del primer tallo floral (Pouteau y Albertini, 2009). Cuando analizamos el número total de hojas producidas, observamos que, en general, las plantas *swc4i 712* no presentaban cambios significativos respecto al parental silvestre (Fig. 38C y F). Por el contrario, cuando se analizó el número de días transcurridos hasta que aparece el botón floral, las plantas *swc4i 712* sufrieron un retraso respecto a Col, en DC pero no en DL (Fig. 38 B y E). Hay que señalar que aproximadamente un 40% de las plantas *swc4i 712* cultivadas en condiciones de DC no florecen o lo hacen con mucho retraso, comparado con la planta silvestre y son estas plantas *swc4i 712*, las que presentan una mayor reducción en el tamaño de la roseta. Por esta razón, no se ha podido cuantificar el tiempo de floración en la totalidad de individuos crecidos en DC, sino tan solo en aquellos que completaron su ciclo de floración (Fig. 38).



**Fig. 38. Cuantificación de distintos aspectos del desarrollo vegetativo y reproductivo de *swc4i 712*.** (A y D) Medida del diámetro de la roseta de Col y *swc4i 712* en condiciones de DL y DC, respectivamente. (B y E) Cuantificación del número de días transcurridos hasta la aparición del botón floral de Col y *swc4i 712* en condiciones de DL y DC, respectivamente. (C) Duración de las etapas del desarrollo vegetativo de Col, *swc6-1* y *swc4i 712* cultivadas en DL. Cuantificación del número de hojas juveniles, adultas y caulinares de estos mutantes, respecto al ecotipo silvestre, basándonos en la distribución de los tricomas de las hojas y en la morfología foliar. (F) Cuantificación del tiempo de floración medido en número de hojas totales de Col y *swc4i 712* en condiciones de DC. Aproximadamente, el 40% de las plantas cultivadas en DC no florecen, al menos, antes de 120 días de cultivo.

## 2.5. Análisis de la expresión de genes de floración en plantas *swc4i 712*

El análisis fenotípico realizado de las plantas *swc4i 712*, nos permite determinar que estas plantas no presentan alteraciones significativas en el número de hojas que producen antes de florecer. Sin embargo, las plantas *swc4i 712* sí presentan un aumento en el número de días que necesitan para producir el botón floral, en condiciones de DC, si lo comparamos con una planta silvestre. Estas observaciones nos llevaron a realizar un estudio detallado de la expresión de diferentes genes relacionados con la floración como *FT*, *SOC1* y *FLC* mediante aproximaciones de qPCR, tanto en condiciones de DL como en DC (Fig. 39). Para estos experimentos incluimos como control en el análisis, además de una planta de tipo silvestre, Col, al mutante *swc6-1*, ya que presenta un claro fenotipo de floración temprana sustentado por una subida en la expresión de *FT* y *SOC1* y por un descenso en los niveles de expresión de *FLC* (Lázaro et al., 2008) (Fig. 14).



**Fig. 39. Análisis de la expresión de los genes de floración *FT*, *SOC1* y *FLC* en plantas *swc4i 712*.** Experimentos de qPCR con muestras de cDNA obtenido de RNAs extraídos de plántulas Col, *swc6-1* y *swc4i 712* cultivadas durante 11 días en condiciones de DL y 19 días, en DC. (A) Expresión de *FT* a ZT 16 en DL y ZT 8 en DC. (B) Expresión de *SOC1* a ZT 8 en DL y ZT 4 en DC. (C) Expresión de *FLC* a ZT 4 en DL y ZT 8 en DC. La hora ZT0 corresponde al inicio del periodo de iluminación. Usamos como control de este experimento la expresión del gen  $\beta$ -*ACT1*.

Según se muestra en la figura 39, la expresión de los genes *FT*, *SOC1* y *FLC* no cambia significativamente en plantas *swc4i 712* cultivadas en condiciones de DL, en comparación con plantas Col, datos que coinciden con el tiempo de floración que presentan estas plantas con *SWC4* silenciado, en dichas condiciones. Por el contrario, en condiciones de DC, aunque la expresión de *SOC1* y *FLC* no mostró cambios significativos (Fig. 39B y C), sí se observó un aumento en la expresión de *FT*, en *swc4i 712* respecto a la planta de tipo silvestre (Fig. 39A). Estos datos contrastan con el fenotipo de floración observado en las plantas *swc4i 712* cultivadas bajo condiciones de DC, que muestran un retraso en el momento de aparición del botón floral. Estas alteraciones en la expresión de *FT* podrían no ser determinantes para modificar el tiempo de floración de las plantas *swc4i 712*. Por lo tanto, en condiciones de DL, es posible que las pequeñas variaciones que se producen en los niveles de expresión de los genes de floración *FT*, *SOC1* y *FLC* en *swc4i 712*, no alcancen los umbrales necesarios para inducir un cambio que se vea reflejado en el fenotipo de floración.

Podemos concluir que los cambios observados en los niveles de expresión de los genes *FT*, *SOC1* y *FLC*, no se corresponden aparentemente con las alteraciones observadas en el tiempo de floración de las plantas *swc4i 712* cultivadas en DC. Por su parte, el hecho de que las semillas de *swc4i 712* presenten dificultades para germinar y que dichas plantas desarrollen alteraciones fenotípicas muy pleiotrópicas, como un porte muy reducido, una disminución del número de plantas que florecen en DC, así como una reducción en el tamaño de las hojas, flores y silicuas, y una disminución de la fertilidad, también sugiere que el silenciamiento de la expresión de *SWC4* está impidiendo un desarrollo normal de la planta, incluso antes de que se produzca la transición floral. Por tanto, *SWC4* podría estar implicado en múltiples aspectos del desarrollo de las plantas, como la formación del embrión, el desarrollo y la germinación de las semillas o el desarrollo de raíces, hojas y flores.

A diferencia de lo ocurre en otros mutantes del *SWR1-C* de *Arabidopsis*, como *esd1-10*, *swc6-1* o *pie1*, que presentan un fenotipo de floración temprana (Noh y Amasino, 2003; Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008), en el caso de plantas *swc4i 712*, no se aprecian cambios significativos en el tiempo de floración, si lo cuantificamos como el número total de hojas de roseta y caulinares producidas antes de la primera flor (Fig. 38C y F). Para corroborar estos datos, medimos la duración de las fases de desarrollo vegetativo cuantificando el número de hojas juveniles, adultas y caulinares de plantas *swc4i 712* y lo comparamos con los datos obtenidos para el mutante *swc6-1* y el correspondiente ecotipo silvestre. Estas mediciones nos indican

que no se producen cambios significativos en la duración de ninguna de las etapas del desarrollo de *swc4i 712* en condiciones de DL (Fig. 38C). Sin embargo, estas plantas *swc4i 712* sí manifiestan otras alteraciones que afectan a caracteres vegetativos y reproductivos que intervienen en su normal desarrollo, y que además se acentúan en condiciones de DC.

Una de las alteraciones fenotípicas características que presentan las plantas *swc4i 712* es el acortamiento en la longitud de la raíz primaria (Fig.37) y el menor porte de la planta en general (Fig.32). Estas alteraciones se podrían explicar como consecuencia de una reducción del número de células y/o una reducción en la elongación de estas células (Zhu et al., 2011). Estas características morfológicas observadas en *swc4i 712*, junto con el desarrollo de hojas de roseta más pequeñas y fuertemente rizadas, nos llevó a analizar el tamaño celular y el número de células por superficie foliar presente en dichas plantas.

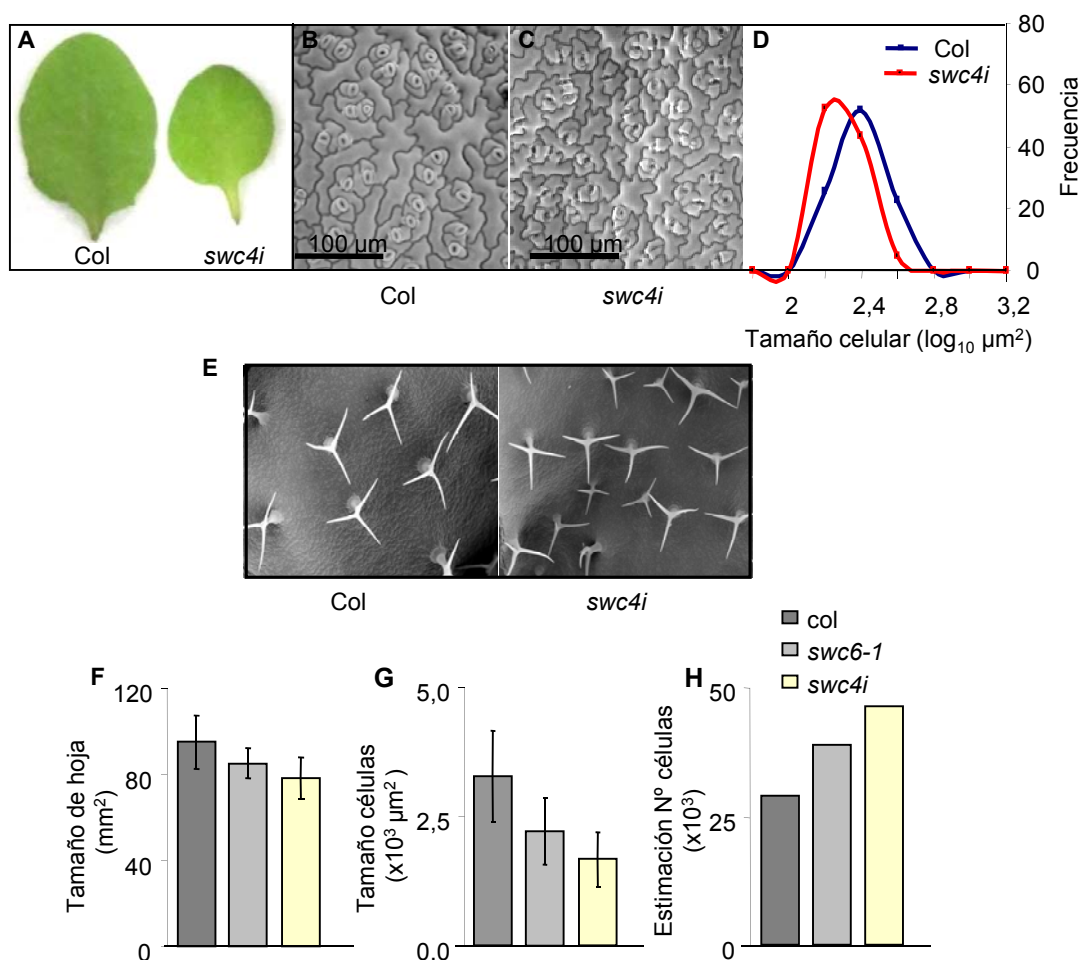
## **2.6. Análisis del tamaño y la proliferación celular de plantas con SWC4 silenciado**

La reducción en el tamaño de los distintos órganos de las plantas *swc4i 712*, tales como la raíz principal, las hojas de roseta y flores, que se acentúa en condiciones de DC, podría reflejar una alteración en el número y/o tamaño de las células que los forman (Mizukami y Fischer, 2000). Estos datos sugieren que *SWC4* podría estar implicado, directa o indirectamente, en la regulación del ciclo celular.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que el desarrollo de los órganos en plantas superiores consiste en un proceso post-embionario que continúa a lo largo del ciclo de vida de la planta (Gutiérrez, 2005; Ramírez-Parra, et al., 2005). Este modelo de desarrollo multicelular requiere de una íntima relación entre los procesos de proliferación y expansión celular, con los de organogénesis (Gutiérrez, 2005; Ramírez-Parra et al., 2005; Beemster et al., 2006; Desvoves et al., 2006; Inze y Veylder, 2006). Un ejemplo de este hecho, ocurre cuando la división celular es inhibida, ya sea como parte del desarrollo natural de la hoja o de forma artificial, causada por una mutación (Meagher et al., 2007). En estas circunstancias, la expansión celular puede continuar a través del endociclo, produciendo hojas que visualmente son normales pero que contienen células con mayor tamaño y ploidía (Meagher et al., 2007). Por su parte, mutaciones que inhiben el endociclo y como consecuencia la expansión celular, pueden originar plantas con hojas de menor tamaño (Meagher et al., 2007). En base a estas observaciones se

ha determinado que las señales recibidas a nivel celular y de órgano, se integran para controlar el desarrollo de las hojas (Meagher et al., 2007).

Con el fin de profundizar en el origen del menor tamaño foliar de plantas *swc4i 712* y en la causa que lo promueve, ya sea por defectos en la división o en la expansión celular, realizamos una serie de mediciones en las hojas de roseta y del tamaño celular de plantas *swc4i 712* y las comparamos con las de su correspondiente parental silvestre. Todas las cuantificaciones se realizaron en plantas cultivadas en condiciones de DC durante 32 días, mediante análisis microscópico de la tercera y cuarta hoja de la roseta, siguiendo protocolos ya descritos (Mathur et al., 2003; Ramírez-Parra et al., 2007) (Fig.40). En primer lugar, observamos que el tamaño de las hojas de *swc4i 712* era aproximadamente un 20% menor en comparación con las hojas de una planta de tipo silvestre (Fig. 40A). Además, el área de las células de la epidermis de la cara abaxial de la tercera y cuarta hoja de roseta de plantas *swc4i 712* se reducía casi a la mitad respecto al tamaño observado en las células epidérmicas de hojas silvestres (Fig. 40B-D). Finalmente, el número de células epidérmicas por el área total de la hoja de *swc4i 712* resultó ser mayor respecto a Col, ya que aumenta drásticamente en más de un 40%. Todos estos datos indican que el silenciamiento de *SWC4* provoca una estimulación de la proliferación celular en la epidermis de las hojas de roseta de plantas *swc4i 712*. Este hecho coincide con un aumento en la densidad de tricomas observado en la cara adaxial de las hojas de roseta de *swc4i 712* como se muestra en la figura 40E.



**Fig. 40. Efecto del silenciamiento de SWC4 sobre el tamaño celular y foliar.** (A) Fotografía donde se muestra el tamaño de la cuarta hoja de roseta de plantas Col y *swc4i* 712 cultivadas en DC durante 32 días. (B y C) Imagen SEM de las células epidérmicas de la cara abaxial de la cuarta hoja de roseta de Col y *swc4i* 712 (200x). (D) Distribución según el tamaño de las células ( $\log_{10} \mu\text{m}^2$ ) que componen la epidermis de la cara abaxial de las hojas que se muestran en las figuras B y C. (E) Imagen SEM de la superficie foliar adaxial de una hoja de roseta donde se muestra una mayor densidad de tricomas en *swc4i* 712 respecto a Col. (F) Cuantificación del área foliar de hojas de roseta de los distintos genotipos medidos en  $\text{mm}^2$ . (G) Cuantificación del área de células epidérmicas de la cara abaxial de hojas de roseta de plantas Col y *swc4i* 712. (H) Estimación del número de células epidérmicas presentes en la cara abaxial ( $\times 10^3$ ) de una hoja de roseta completa, en los distintos genotipos. Todos los datos de cuantificación del tamaño de hoja y del área celular se obtuvieron a partir de la tercera y cuarta hoja de plantas Col y *swc4i* 712 cultivadas en condiciones de DC durante 32 días.

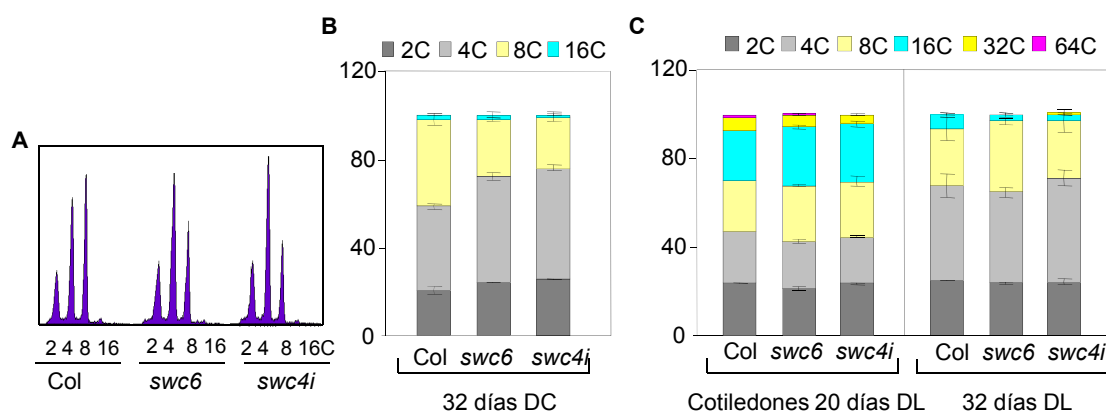
En resumen, tanto el tamaño de las hojas, como el tamaño de las células epidérmicas de las mismas, es menor en plantas *swc4i* 712 comparado con el correspondiente parental silvestre (Fig. 40A-D). Sin embargo, las hojas de las plantas *swc4i* 712 contienen un mayor número de células epidérmicas por superficie foliar, que las de Col (Fig. 40H). Frecuentemente se ha asociado un mayor tamaño celular con un aumento de la ploidía producida por sucesivas rondas de endorreplicación (Kondorosi et al., 2000; Larkins et al., 2001; Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003). Durante la formación

de la hoja se produce una transición entre los procesos de división celular y el endociclo que se encuentran acoplados para regular el desarrollo foliar (Ramírez-Parra et al., 2007). De esta manera, a lo largo de la fase inicial del desarrollo de las hojas en *Arabidopsis*, el ritmo al que se dividen las células es constante y la mayoría de las células tienen un contenido de DNA, 2C y 4C (Meagher et al., 2007). Conforme aumenta el desarrollo de la hoja, la velocidad de división celular disminuye y finalmente, una hoja madura incrementa el porcentaje de células con contenido 4C, 8C y 16C (Meagher et al., 2007). Por esta razón, los cotiledones maduros de plantas Col presentan elevados niveles de células con un contenido de DNA, 16C y 32C, si lo comparamos con hojas de roseta de plantas cultivadas en DL, ya que éstos alcanzan su madurez antes que los demás órganos foliares.

Para comprobar si el menor tamaño de las células en plantas *swc4i 712* conlleva también una alteración en la transición al endociclo, decidimos llevar a cabo un estudio detallado de los niveles de ploidía de las células de las hojas de estas plantas, mediante análisis de citometría de flujo. Según los datos obtenidos de este estudio y recogidos en la figura 41, existen claras alteraciones en los niveles de ploidía de las células que conforman las hojas 3 y 4 de plantas *swc4i 712*, particularmente en condiciones de DC (Fig. 41A-B). En estas condiciones de cultivo, se observa un aumento del número de células 2C y 4C que componen las hojas de roseta 3 y 4, y un descenso de las células 8C y 16C, que determina la cantidad de DNA nuclear, en comparación con los niveles de ploidía determinados en hojas de plantas Col (Fig. 41B). Estos datos nos indican que las hojas de plantas *swc4i 712* presentan una inhibición del endociclo, ya que disminuye el porcentaje de células con contenido de DNA, 8C y 16C, respecto a las hojas de la planta control Col. Por otra parte, en las células de hojas de roseta de plantas *swc4i 712* cultivadas durante 32 días en DL, donde las diferencias de tamaño foliar son menos drásticas que en las hojas de plantas cultivadas en DC, solo se observan cambios sutiles en los valores del contenido de DNA nuclear (Fig. 41C). Tampoco, el análisis de los cotiledones de plántulas *swc4i 712* cultivadas en condiciones de DL, *in vitro*, durante 20 días, muestra variaciones significativas en la carga génica asociadas al silenciamiento de *SWC4*.

Las plantas mutantes *swc6-1* también presentan ligeras alteraciones en el tamaño foliar y el área celular, similares a las mostradas por las plantas *swc4i 712* (Fig. 40F-H). Sin embargo, en mutantes *swc6-1*, estas alteraciones son más sutiles ya que el tamaño de las hojas apenas disminuye un 10% respecto al tamaño foliar en plantas silvestres y, aunque las células epidérmicas también muestran menor área, la relación del número

de células por área foliar total difiere tan solo un 20% respecto a Col, frente al 40% de diferencia que se observa en el número de células por área total de las hojas de plantas *swc4i 712* (Fig. 40H). Los cambios en la ploidía observados en los mutantes *swc6-1* respecto a la planta de tipo silvestre también son pequeños, aunque se observa un ligero aumento de las células con carga 2C y 4C y un descenso de las células 8C y 16C, concretamente en plantas cultivadas bajo condiciones de DC (Fig. 41A y B). Los análisis realizados en DL, ya sean de la 3ª y 4ª hoja de la roseta de plantas cultivadas en tierra durante 32 días, como de los cotiledones de plántulas cultivadas *in vitro* durante 20 días, no muestran variaciones significativas en la carga génica de *swc6-1*, si lo comparamos con el ecotipo silvestre (Fig. 41C). Estos datos indican que en mutantes *swc6-1* también se está promoviendo un aumento de los niveles de proliferación celular y un descenso en la entrada al endociclo en DC, aunque estas variaciones son menores que las ocurridas en plantas *swc4i 712*.



**Fig. 41. Análisis de los niveles de ploidía de plantas *swc4i 712*.** (A) Perfiles del contenido de células con carga génica 2C, 4C, 8C y 16C, obtenidos en los distintos genotipos analizados, cultivados en condiciones de DC durante 32 días. (B) Cuantificación de células con distinta carga de DNA nuclear, que componen la 3ª y 4ª hoja de plantas Col, *swc6-1* y *swc4i 712* cultivadas en tierra durante 32 días en DC. (C) Cuantificación de las células con distinta carga de DNA nuclear, de plantas Col, *swc6-1* y *swc4i 712*, cultivadas en condiciones de DL, tanto de cotiledones, de plántulas cultivadas 20 días en placas con medio MS, como de la 3ª y 4ª hoja de plantas cultivadas en tierra durante 32 días.

En definitiva, las plantas *swc4i 712* presentan alteraciones fenotípicas, particularmente en condiciones de DC, tales como un menor tamaño del área foliar y del área celular y mayor número de células por superficie total de la hoja, en comparación a lo observado en hojas de Col (Fig. 40). Estos defectos en el número y tamaño de las células podrían explicar el fuerte rizamiento que sufren las hojas de roseta de *swc4i 712* cuando son cultivadas bajo condiciones de fotoperiodo no inductivos, tal y como se describe para las plantas de *Arabidopsis* con el gen *ARP7* silenciado, donde la



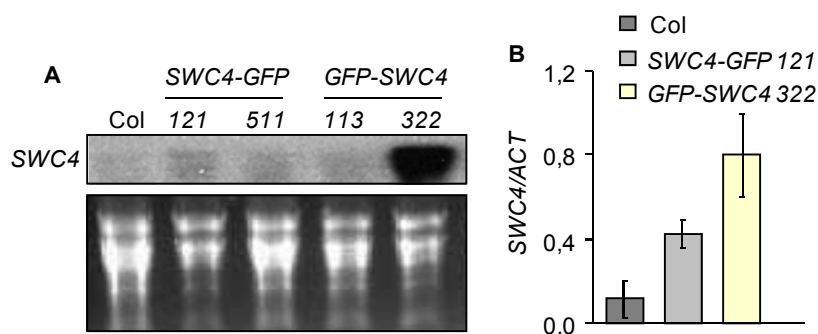
concentración de células epidérmicas de menor tamaño y una expansión celular no uniforme, provocan un fuerte rizamiento de las hojas de roseta (Kandasamy et al., 2005b; Meagher, et al., 2007) (Fig. 36A-C). Como hemos demostrado, las plantas *swc4i 712* presentan hojas de roseta constituidas por un elevado número de células que contienen menor carga génica indicando una inhibición del endociclo (Fig. 40-41), lo que sugiere la existencia de posibles alteraciones en la regulación de las distintas transiciones del ciclo celular como consecuencia del silenciamiento de la expresión de *SWC4*. Al igual que ocurre con plantas *swc4i 712*, en los mutantes *swc6-1* también hemos observado una reducción del tamaño de la hoja y del área celular, así como un aumento de la relación del número de células por hoja de roseta, si bien estas diferencias son menores que las mostradas por plantas *swc4i 712*, comparado con la planta silvestre. Además, se ha comprobado que en mutantes *swc6-1* existe un descenso en los niveles de ploidía de las células que conforman las hojas de dichas plantas (Fig. 41A-B). La posible inhibición del endociclo ocasionada por el silenciamiento de *SWC4* podría promover el ciclo mitótico proliferativo y de hecho, el balance entre la división celular y la endorreplicación es crucial en el desarrollo de las hojas en *Arabidopsis* (Gutiérrez, 2009). Por ello, el aumento del número de células por hoja podría originarse como consecuencia de una menor expansión celular y con ello, intentar compensar el tamaño del órgano (Melaragno et al., 1993; Traas et al., 1998; Beemster et al., 2006).

## 2.7. Caracterización fenotípica de plantas sobreexpresoras de *SWC4*

Con el fin de profundizar en la función que ejerce el gen *SWC4* en el control de diferentes procesos del desarrollo de *Arabidopsis*, hemos analizado el efecto de la ganancia de función de este gen. Para ello, hemos generado plantas transgénicas que sobreexpresan *SWC4* fusionado o no a diferentes epítomos.

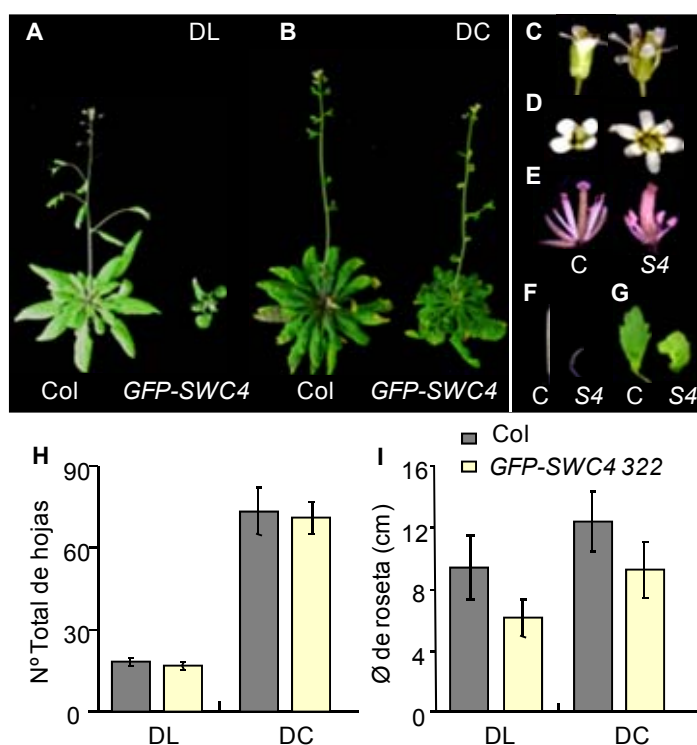
En un primer estudio de la sobreexpresión de *SWC4*, analizamos plantas *Col* transformadas de forma estable con una construcción que contenía el cDNA de *SWC4* fusionado al gen *GFP* por su extremo amino-terminal, dirigida por el promotor *35S*. Estas plantas desarrollaban un fenotipo característico, muy similar al que mostraba la línea *swc4i 712*, con *SWC4* silenciado (Fig. 32, 43). Una vez que establecimos líneas homocigotas con una única inserción de la construcción *35S::GFP-SWC4*, seleccionamos, mediante técnicas de northern blot y qPCR, la línea *35S::GFP-SWC4/Col 322* por ser la que presentaba mayores niveles de expresión de *SWC4* (Fig. 42). Las plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* presentaban un fenotipo caracterizado por un

menor porte en general, un acortamiento de los entrenudos, clara pérdida de dominancia apical y un amarilleamiento de las hojas, además de presentar una fuerte reducción en el tamaño de la roseta tanto en DL como en DC (Fig. 43I). Otra de las características observadas en estas plantas es una alteración en la organización de la disposición de los pétalos en las flores y la presencia de flores con un número extra de pétalos (Fig. 43D). Las flores de *35S::GFP-SWC4/Col 322* presentan un menor número de estambres, concretamente cuatro y son de menor tamaño, comparados con los seis estambres que presentan las flores de una planta silvestre (Fig. 43E) y muestran carpelos engrosados (Fig. 43E). Estas alteraciones en las flores de plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322*, se traducen en la producción de silicuas con una severa reducción del tamaño, que además muestran una forma curvada (Fig. 43F). Adicionalmente, en las plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* al igual que ocurre en las plantas *swc4i 712*, las hojas de roseta y la primera hoja caulinar muestran menor tamaño y, también presentan un aspecto rizado y bordes muy curvados, si las comparamos con las hojas de una planta silvestre (Fig. 43A-B y G). Finalmente, hemos observado que las plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* cultivadas bajo condiciones de DC, no florecen o lo hacen con un fuerte retraso, por lo que cuantificamos el tiempo de floración en base al número de hojas producidas tan solo en aquellas plantas que completaron su ciclo de floración y no para la totalidad de individuos cultivados en DC (Fig. 43H). Estos datos no reflejan cambios significativos en el fenotipo de floración de las plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322*, respecto a la planta silvestre (Fig. 43H).



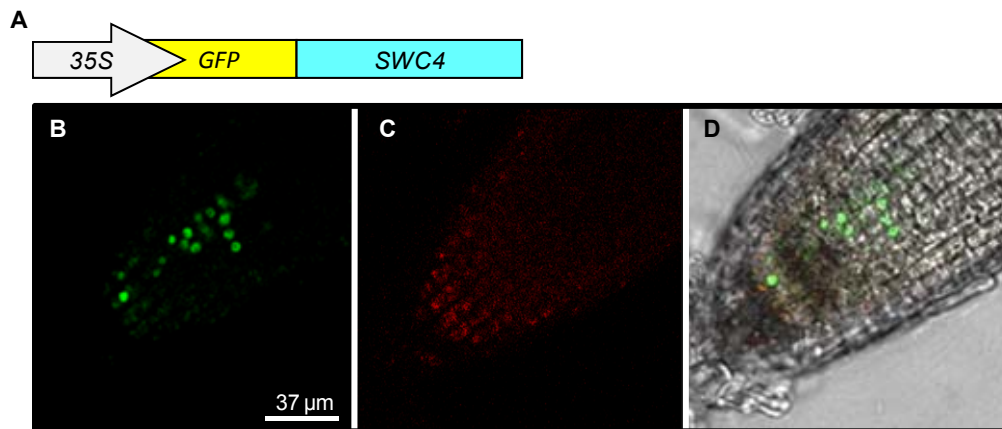
**Fig. 42. Análisis de la expresión de SWC4 en plantas sobreexpresoras *35S::GFP-SWC4*.** (A) Análisis de la expresión de SWC4 mediante northern blot, en plantas transformadas con la construcción de SWC4 fusionado a GFP, tanto por su extremo carboxilo- (líneas 121 y 511) como amino-terminal (113 y 322). Para la hibridación, se utilizaron 10µg de RNA total extraído de plántulas cultivadas durante 2 semanas, en DL y como sonda, se utilizó un fragmento correspondiente a la región 3' de SWC4 comprendida entre los cebadores F2 y R2 (Fig. 26). (B) Análisis de expresión de SWC4 mediante qPCR en Col y *35S::SWC4-GFP/Col 121* y *35S::GFP-SWC4/Col 322*. Se utilizó para este experimento cDNA obtenido de plántulas cultivadas en DL durante 15 días. Usamos como control, la expresión del gen  $\beta$ -ACT1.

Otras líneas de sobreexpresión fueron seleccionadas como homocigotas para la inserción de la construcción del gen *SWC4* fusionado a *GFP*, tanto por su extremo amino como por su extremo carboxilo-terminal (Fig. 42A). Sin embargo, cuando analizamos en detalle el fenotipo de dichas líneas sobreexpresoras de *SWC4*, observamos que no presentaban ninguna alteración característica y tampoco manifestaban cambios en el tiempo de floración, según el número total de hojas producidas, respecto a la planta silvestre. El estudio de la expresión de *SWC4* en estas plantas *35S::GFP-SWC4/Col 113* y *322* y *35S::SWC4-GFP/Col 121* y *511* mediante northern blot, reveló que no alcanzaban unos niveles de expresión de *SWC4* tan elevados como los que presentan las plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322*, lo que podría explicar la ausencia de alteraciones fenotípicas en dichas plantas (Fig. 43).



**Fig. 43. Caracterización fenotípica de plantas sobreexpresoras de *SWC4*, *35S::GFP-SWC4/Col 322*.** (A) Fenotipo de floración de plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* cultivadas en DL durante 30 días y (B) en condiciones de DC, durante 80 días. (C) Análisis fenotípico de flores de Col y *35S::GFP-SWC4/Col 322*. (D) Imagen mostrando la disposición y el número de pétalos extra en flores de *35S::GFP-SWC4/Col 322*, respecto a Col. (E) Las plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* presentan flores con menor número de estambres y carpelos engrosados, comparado con Col. (F) Silicuas de la planta silvestre y de *35S::GFP-SWC4/Col 322* que sufre una fuerte curvatura y una reducción del tamaño. (G) Primera hoja caulinar de plantas Col y de la línea sobreexpresora de *GFP-SWC4*. (H) Cuantificación del tiempo de floración medido en número de hojas totales de Col y *35S::GFP-SWC4/Col 322* en condiciones de DL y DC. (I) Medida del diámetro de la roseta expresado en cm, de la planta silvestre y de la línea *35S::GFP-SWC4/Col 322* en condiciones de DL y DC.

El análisis realizado mediante microscopía confocal de la raíz principal de plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* nos permitió localizar la sobreexpresión de la proteína de fusión GFP-SWC4 en el núcleo de las células de *Arabidopsis* (Fig.44), de forma similar a lo observado en los experimentos de expresión transitoria de *35S::SWC4-GFP* en *N. benthamiana*, donde dicha proteína de fusión se expresaba en los núcleos de las células epidérmicas de las hojas (Fig. 25).



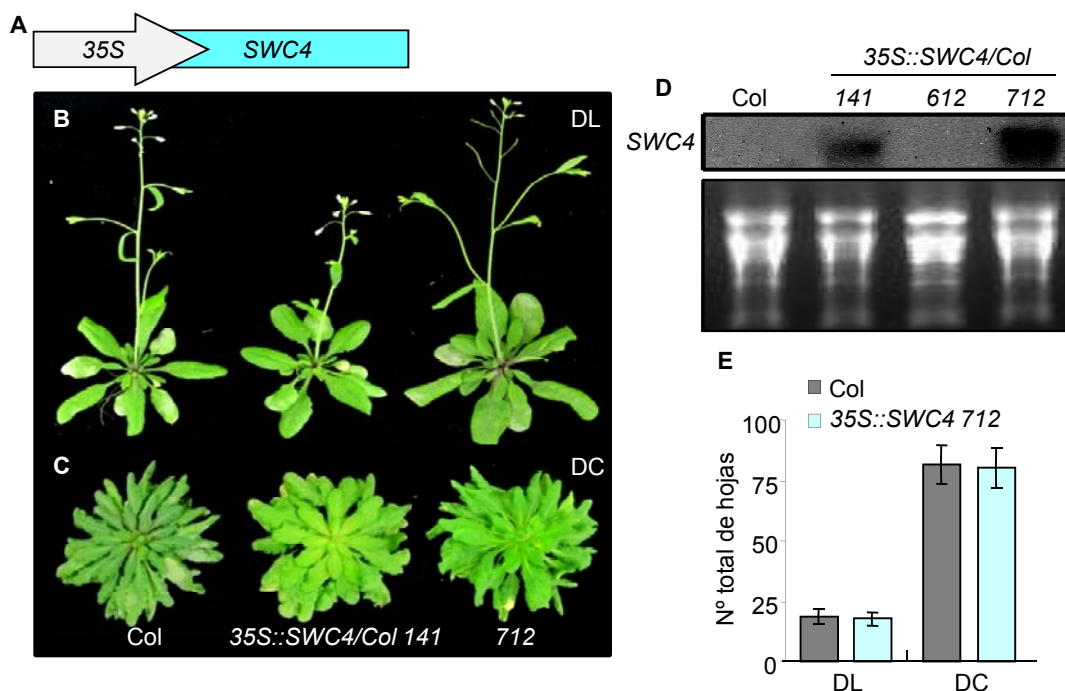
**Fig. 44. Localización subcelular de SWC4 fusionado a GFP en plantas de Col transformadas de forma estable.** (A) Esquema de la construcción *35S::GFP-SWC4* transformada en plantas Col. (B) Imagen de fluorescencia tomada mediante microscopía confocal, de una proteína de fusión GFP-SWC4 sobreexpresada en los núcleos de células de la raíz principal. (C) Imagen de la autofluorescencia emitida por las células presentes en la raíz principal de estas plantas. (D) Superposición de ambas imágenes B y C donde se muestra que la fluorescencia emitida por GFP se localiza de forma independiente a la autofluorescencia de las células contenidas en estos tejidos. Estas plantas fueron cultivadas en condiciones de DL en medio MS, durante 10 días. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Leica LCS Lite.

Entonces, la sobreexpresión del gen *SWC4* fusionado a *GFP* por su extremo amino-terminal, en plantas transgénicas, origina alteraciones fenotípicas visibles, muy similares a las observadas en plantas *swc4i 712* donde *SWC4* se encuentra silenciado. A pesar de que la fusión GFP-SWC4 está sobreexpresándose en los núcleos de células del meristemo radicular de plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* (Fig. 44), el fenotipo mostrado por dichas plantas sugiere que podrían estar expresando una proteína de fusión no funcional que estuviese interfiriendo con la versión silvestre de la proteína *SWC4*, provocando alteraciones pleiotrópicas del fenotipo similares a las observadas en *swc4i 712*. Otra posible explicación del fenotipo revelado por las plantas *35S::GFP-SWC4/Col 322* consiste en que, aunque la construcción génica *35S::GFP-SWC4* se exprese correctamente y sea funcional, podría originar un efecto venenoso en la planta, de tal manera que, un exceso de dicha proteína de fusión contribuya a un mal

funcionamiento del complejo proteico en el que participa la proteína SWC4. Independiente del mecanismo por el que se produce, la sobreexpresión de *GFP-SWC4* se traduce en un fenotipo muy pleiotrópico, con alteraciones importantes en el desarrollo y en la morfología de los órganos florales, una fuerte atrofia en el desarrollo de las silicuas, dificultad para florecer en DC y una reducción del tamaño general de las plantas. Tampoco afecta de manera notoria al tiempo de floración de *35S::GFP-SWC4/Col 322*, al igual que ocurría en plantas *swc4i 712*.

El estudio de otras líneas transgénicas sobreexpresoras del gen *SWC4* fusionado a diferentes epítomos, como las líneas *35S::4xMYC-SWC4/Col 411* y *443* y *35S::SWC4-9xMYC/Col 133* y *211*, no reveló ningún cambio en el fenotipo de estas plantas, siendo similar al fenotipo de las plantas silvestres. Tampoco las plantas sobreexpresoras del gen *SWC4* sin ningún epítomo, dirigida por el promotor *35S*, como las líneas *35S::SWC4/Col 141* y *712*, presentaron alteraciones fenotípicas visibles (Fig. 45). Estos datos nos llevan a pensar que probablemente, es la fusión de la proteína GFP al extremo amino-terminal de SWC4, lo que produce defectos en el fenotipo de la planta, provocando alteraciones pleiotrópicas que se asemejan al efecto causado por un silenciamiento de *SWC4* en plantas Col (Fig. 36, 43).

Los análisis realizados con las líneas transgénicas sobreexpresoras del gen *SWC4*, fusionado o no a determinados epítomos, no aportaron datos relevantes para esclarecer algún aspecto de la función de *SWC4* en *Arabidopsis*, dada la ausencia de alteraciones fenotípicas en dichas plantas. Es probable, que la sobreexpresión únicamente de *SWC4*, una proteína que forma parte de complejos proteicos constituidos por varias de subunidades, no afecte a la composición de los mismos, de manera que no provoca alteraciones fenotípicas en dichas plantas.



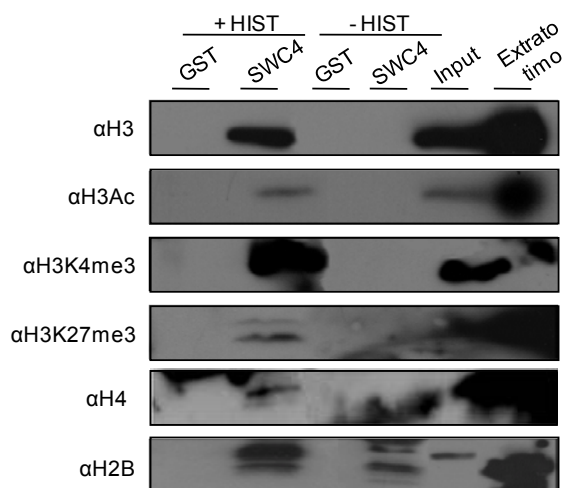
**Fig. 45. Caracterización fenotípica de líneas sobreexpresoras de SWC4 sin fusionar a ningún epítipo.** (A) Esquema de la construcción genética 35S::SWC4 transformada de forma estable en plantas Col. (B) Fenotipo de floración de plantas transgénicas 35S::SWC4/Col 141 y 712 cultivadas en DL, durante 28 días y (C), en DC durante 80 días (D) Análisis mediante northern blot de la expresión de SWC4, con mRNA extraído de plantas transgénicas 35S::SWC4/Col 141, 612 y 712 que expresan el gen SWC4 bajo el control del promotor 35S. Para la hibridación del RNA se utilizaron 10ug de RNA total extraído de plántulas cultivadas en DL, durante 2 semanas y como sonda se utilizó un fragmento correspondiente a la región 3' de SWC4 comprendida entre los cebadores F2 y R2 (Fig. 26). (E) Cuantificación del tiempo de floración según el número de hojas totales producidas por plantas Col y 35S::SWC4/Col 712, en DL y DC.

## 2.8. Ensayos de unión de SWC4 a extractos de histonas de Arabidopsis

Como se ha descrito anteriormente, la proteína Swc4 de levaduras contiene un dominio SANT implicado en la interacción con histonas y/o DNA (Boyer et al., 2004). Con el fin de determinar si esto también ocurría con la proteína SWC4 ortóloga en Arabidopsis, nos propusimos realizar ensayos de unión con histonas extraídas de células MM2d de Arabidopsis en cultivo (Fujiyama et al., 2002). Este tipo de ensayos se ha usado previamente con éxito para detectar la unión de la proteína ORC1 de Arabidopsis a la marca H3K4me3 (Sánchez y Gutiérrez, 2009).

En este caso utilizamos la proteína SWC4 completa, acoplada al epítipo GST. La unión de dicha proteína recombinante con las histonas de Arabidopsis se visualizó mediante experimentos de western blot, empleando anticuerpos específicos  $\alpha$ H3,  $\alpha$ H3Ac,  $\alpha$ H3K4me3,  $\alpha$ H3K27me3 y  $\alpha$ H4. Como se muestra en la figura 46, la proteína

recombinante GST-SWC4 se une a las histonas, H3, H3Ac, H3K4me3, H3K27me3 y H4. Por el contrario, la proteína GST no se une a ninguna de estas histonas extraídas *Arabidopsis* (Fig. 46). Este resultado confirma que SWC4 es capaz de interactuar *in vitro* con las histonas H3, H3Ac, H3K4me3, H3K27me3 y H4, lo que es consistente con la posible implicación de esta proteína en la interacción de los diferentes complejos remodeladores de cromatina, donde participa, con determinadas histonas modificadas o no. Para demostrar si esta interacción se producía de forma específica, realizamos ensayos de unión de la proteína SWC4 con extractos de histonas de *Arabidopsis*, empleando en este caso un anticuerpo específico frente a la histona H2B. Como se observa en la figura 46, no se detectó interacción de SWC4 con la histona H2B, lo que nos permite concluir que las uniones detectadas de SWC4 *in vitro*, con las histonas H3, H3Ac, H3K4me3, H3K4me27 y H4, son específicas.



**Fig. 46. Ensayo de unión de SWC4 a histonas extraídas de cultivos celulares de *Arabidopsis*.**

(A) Experimentos de western blot que revelan la unión de GST-SWC4 y GST, con o sin extracto de histonas procedentes de líneas celulares de *Arabidopsis*, a las distintas histonas utilizando los anticuerpos αH3, αH3Ac, αH3K4me3, αH3K27me3, αH4 y αH2B. GST sin fusionar no se une a las histonas. Como controles de este experimento se utilizó un input con 5% del extracto de histonas de *Arabidopsis* y otro con 1% de un extracto de histonas de timo de ratón.

Finalmente, la caracterización funcional llevada a cabo con la proteína SWC4 de *Arabidopsis*, nos ha permitido concluir que esta proteína está participando en diversos aspectos del desarrollo de la planta, como en la fecundación, el desarrollo embrionario, la formación de semillas y el desarrollo de las hojas, probablemente interviniendo en la progresión del ciclo celular. Además, esta proteína interactúa *in vitro*, tanto con histonas H3 y H4 sin modificar como con histonas modificadas, H3Ac y H3K4me3, asociadas generalmente a estados transcripcionalmente activos, y con H3K27me3,

característica de la represión de la expresión génica (Xu et al., 2008). Estos datos sugieren una posible participación de SWC4 en el anclaje de los complejos remodeladores de la cromatina, como SWR1-C y NuA4-C a regiones concretas del genoma de *Arabidopsis*, enriquecidas en determinadas histonas, siendo SWC4 una parte fundamental del núcleo compartido por ambos complejos.

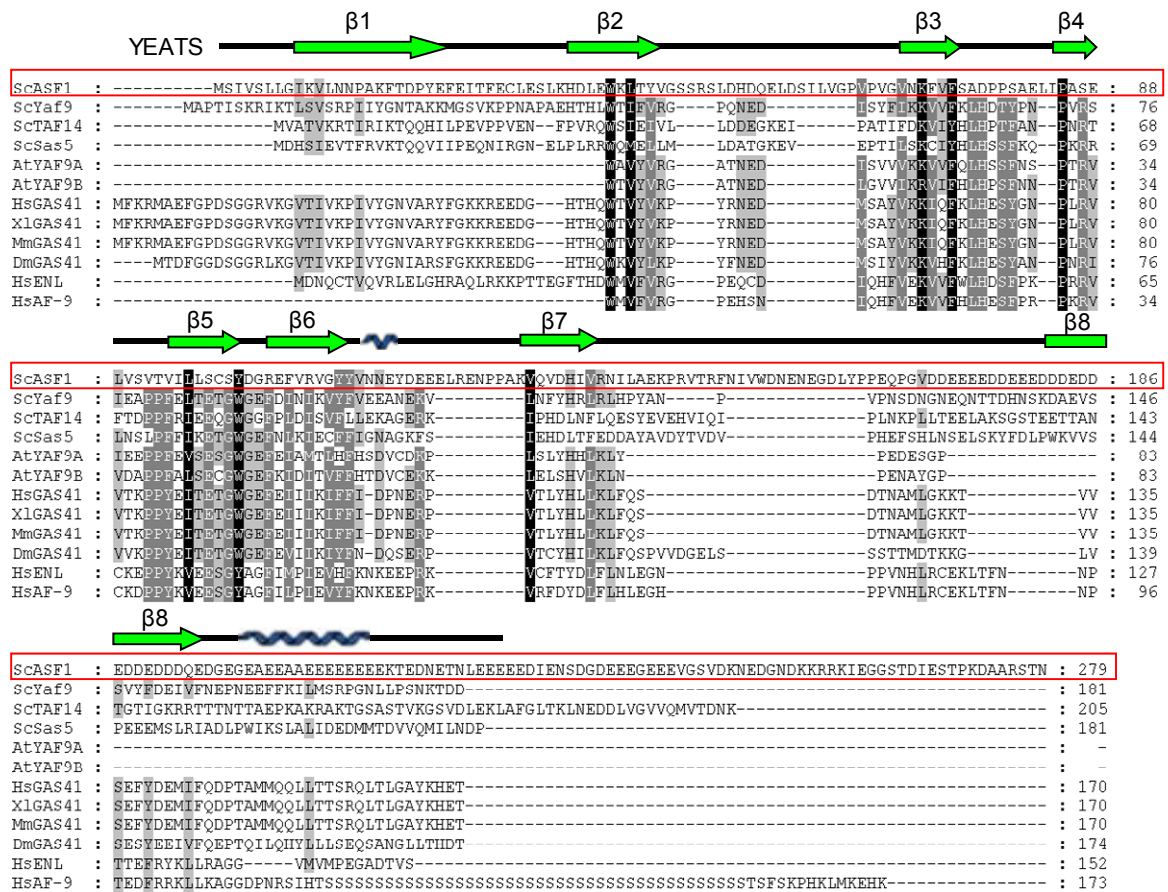


### 3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE POSIBLES ORTÓLOGOS DE YAF9 EN ARABIDOPSIS

#### 3.1. Caracterización genética y molecular de YAF9 en Arabidopsis

Otra de las subunidades que se encuentra compartida por los complejos SWR1 y NuA4 en levaduras es la proteína Yaf9 (Kobor et al., 2004; Wu et al., 2005). Esta proteína participa en el SWR1-C, interaccionando físicamente con Swc4 y Arp4, y es necesaria para la incorporación de la variante H2A.Z en la cromatina y para la acetilación de la histona H4 (Krogan et al., 2003; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Zhou et al., 2010). Por otro lado, en levaduras, Yaf9 interviene en diferentes procesos celulares, como la respuesta del huso mitótico al estrés, la correcta reparación de daños originados en el DNA, así como la regulación a nivel transcripcional de la expresión de genes localizados en las regiones teloméricas de los cromosomas (Zhang et al., 2004; Wu et al., 2005; Wang et al., 2009). La proteína Yaf9 se caracteriza por contener en su extremo amino-terminal un dominio YEATS que se encuentra muy conservado, ya que está presente en una familia de proteínas que contiene más de 100 miembros pertenecientes a más de 70 especies diferentes de eucariotas (Le Masson et al., 2003; Schulze et al., 2009; Wang et al., 2009) (Fig. 47). En *Saccharomyces cerevisiae* existen únicamente 3 proteínas que contienen este dominio, Yaf9, Taf14 y Sas5, y se encuentran codificadas por genes no esenciales para la viabilidad de la levadura (Le Masson et al., 2003; Schulze et al., 2009). En humanos, las proteínas GAS41, ENL y AF9, que contienen el dominio YEATS, están relacionadas, entre otros, con procesos de proliferación celular y cáncer (Schulze et al., 2010).

Estudios realizados en levaduras han demostrado que el dominio YEATS presenta una gran similitud a nivel conformacional, con un dominio presente en la proteína Asf1, una chaperona que se une a las histonas H3 y H4 (Wang et al., 2009). El dominio YEATS de la proteína Yaf9 de levaduras se compone de 8 cadenas  $\beta$  antiparalelas que terminan con dos pequeñas  $\alpha$ -hélices y, al igual que el dominio presente en Asf1, adopta una conformación similar a la de las inmunoglobulinas (Ig), lo que permite el anclaje de proteínas adyacentes a este dominio característico (Bork et al., 1994; Holm et al., 1995; Zhang et al., 2004; Wang et al., 2009) (Fig. 47). En Arabidopsis, la pérdida de función del gen *ASF1* origina alteraciones fenotípicas evidentes, como la inhibición del crecimiento y anomalías en el desarrollo de órganos vegetativos y reproductivos (Zhu et al., 2011).



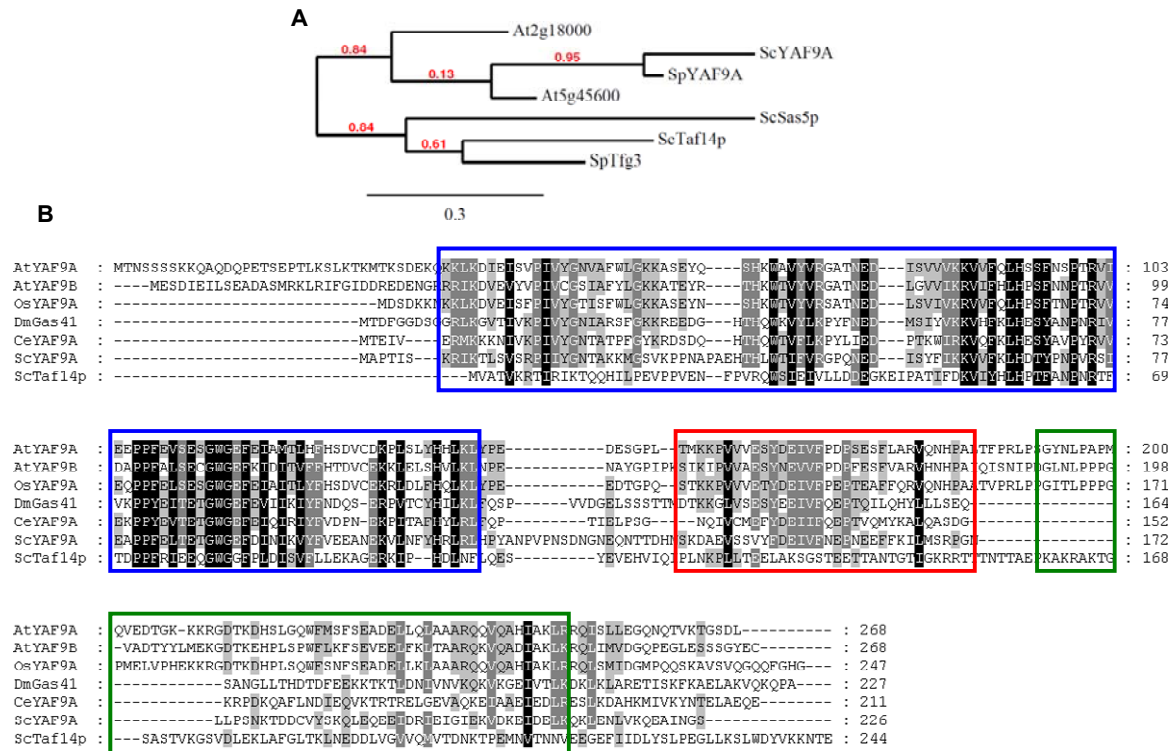
**Fig. 47. El dominio YEATS de la proteína Yaf9 está muy conservado y presenta gran similitud conformacional con el dominio de la proteína Asf1 de levaduras.** Estructura secundaria y aminoácidos conservados en el dominio YEATS. Alineamiento de secuencias del dominio de Asf1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), con los dominios YEATS que muestran aminoácidos conservados en distintos organismos, de las proteínas Yaf9, Taf14 y Sas5 de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), YAF9A y YAF9B de *Arabidopsis thaliana* (At), GAS41 de *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Xenopus laevis* (Xl), *Drosophila melanogaster* (Dm), y ENL y AF-9 de *Homo sapiens*. Los residuos de aminoácidos marcados en negro indican que son idénticos y los que se observan en gris representan aquellos aminoácidos que están conservados en varias de las proteínas alineadas. La estructura del dominio YEATS de Yaf9 es similar al dominio presente en la chaperona Asf1 y ambos presentan una conformación de tipo Ig, formada por 8 cadenas β conservadas, representadas como flechas verdes, y dos hélices alpha, representadas como espirales de color azul.

Con el fin de determinar si existen proteínas con funciones similares a las de Yaf9 de levaduras en plantas, realizamos una búsqueda de posibles ortólogos para este gen en el genoma de *Arabidopsis*. Identificamos dos genes, At5g45600 y At2g18000, que designamos como YAF9A y YAF9B, respectivamente. Estos genes codifican para las únicas proteínas de *Arabidopsis* que contienen un dominio YEATS. Según observamos en las bases de datos consultadas, el gen At2g18000 había sido denominado como TAF14 por algunos autores (Choi et al., 2011) y como YAF9B por otros (Zacharaki et al., 2012). Sin embargo, cuando realizamos un análisis comparativo con las secuencias de

estas proteínas y las descritas para las proteínas Yaf9 de otros organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*, comprobamos que la proteína At2g18000 de *Arabidopsis* muestra una mayor similitud con la proteína Yaf9 que con la proteína Taf14, presentes en estos organismos (Fig.48A). Por este motivo, decidimos designar al gen At2g18000 como *YAF9B*, a lo largo este trabajo.

El gen *YAF9A* contiene 1608 nucleótidos y presenta 6 exones que codifican una proteína de 268 aminoácidos. Por su parte, el gen *YAF9B* contiene 1546 nucleótidos y presenta una estructura genómica similar a la de *YAF9A*, con 6 exones, que codifican también una proteína de 268 aminoácidos. A partir del alineamiento realizado con las secuencias proteicas de *YAF9A* y *YAF9B* de *Arabidopsis*, junto con las proteínas homólogas disponibles en otras especies, observamos que ambas proteínas presentan además del dominio YEATS en el extremo N-terminal, muy conservado, dos dominios adicionales en el extremo C-terminal, denominados caja A y caja B/CC, que contiene un motivo coiled-coil (Zhang et al., 2004; Schulze et al., 2009) (Fig.48B).

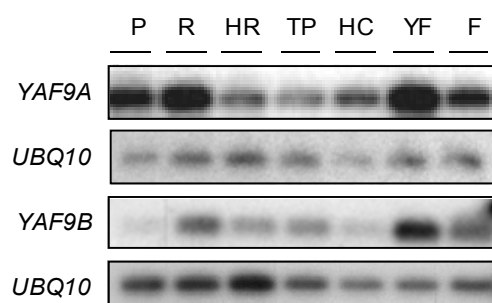
Con el fin de establecer la función de los genes *YAF9A* y *YAF9B*, como componentes de los complejos SWR1 y NuA4 sugeridos en *Arabidopsis* y su posible implicación en el control del tiempo de floración, decidimos analizar a nivel genético y molecular ambos genes.



**Fig. 48. Alineamiento de las proteínas YAF9A y YAF9B de Arabidopsis con ortólogos presentes en otros organismos.** (A) Árbol filogenético construido con las proteínas de (*Sc*) *Saccharomyces cerevisiae* y (*Sp*) *Saccharomyces pombe*, que contienen un dominio YEATS y los dos homólogos de Yaf9 en Arabidopsis, mediante el programa <http://www.phylogeny.fr/version2.cgi>. Para la generación del árbol filogenético se han utilizado las secuencias de aminoácidos de las dos únicas proteínas con dominio YEATS presentes en *Arabidopsis thaliana*, YAF9A y YAF9B, y de Yaf9, Taf14 y Sas5 de *S. cerevisiae* y Yaf9 y Tfg3 de *S. pombe*. (B) Comparación de las secuencias proteicas de AtYAF9A y AtYAF9B con posibles ortólogos en otros organismos. (*At*), *Arabidopsis thaliana*; (*Os*), *Oryza sativa*; (*Dm*), *Drosophila melanogaster*; (*Ce*), *Caenorhabditis elegans*; (*Sc*), *Saccharomyces cerevisiae*; (*Sp*), *Saccharomyces pombe*. Los residuos de aminoácidos marcados en negro indican que son idénticos y los que se observan en gris representan aquellos aminoácidos que están conservados en algunas de las proteínas alineadas. La región contenida en la caja azul corresponde al dominio YEATS y las presentes en las cajas roja y verde corresponden a las cajas A y B/CC, respectivamente.

### 3.2. Análisis del patrón de expresión de *YAF9A* y *YAF9B*

Para analizar los niveles de expresión de los genes *YAF9A* y *YAF9B* en los distintos órganos de *Arabidopsis*, hemos llevado a cabo experimentos de RT-PCR semicuantitativa a partir de RNAs extraídos de plántula completa, raíz, hojas de roseta, tallo principal, hojas caulinares, yemas florales y flores (Fig. 49). Para estos análisis utilizamos cebadores específicos para generar sondas que discriminen ambos genes (Tabla 8). Como se muestra en la figura 49, tanto el transcrito de *YAF9A* como el de *YAF9B* se expresan en todos los órganos analizados, aunque de forma más pronunciada en raíz, flores y yemas florales (Fig. 49). *YAF9A* y *YAF9B* se expresan también en hojas de roseta, tallo y hojas caulinares, aunque en menor medida. En general, los niveles de expresión de *YAF9B* son más bajos en todos los órganos analizados, si los comparamos con los niveles de expresión observados para *YAF9A*. Por otra parte, los patrones de expresión de ambos genes, *YAF9A* y *YAF9B*, son muy similares a los observados para el mensajero de *SWC4* (Fig. 24), lo que indica que dichos genes se expresan en los mismos órganos y por lo tanto las proteínas que codifican, podrían interactuar físicamente entre sí, como ocurre con los homólogos de Yaf9 y Swc4 de levaduras (Krogan et al., 2003; Wu et al., 2009).



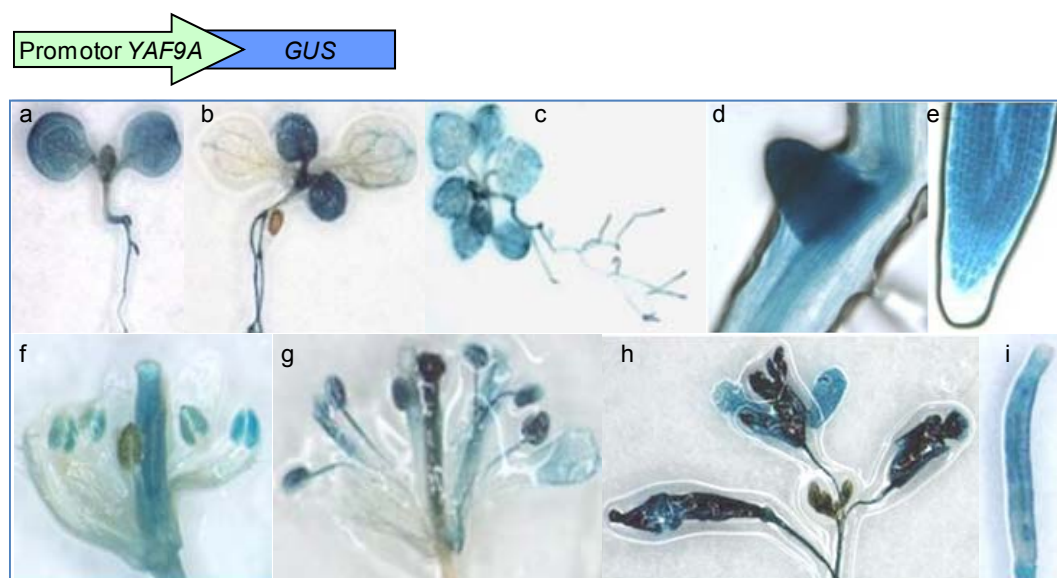
**Fig. 49. Expresión de *YAF9A* y *YAF9B* en distintos órganos de plantas de *Arabidopsis*.** Los ensayos de RT-PCR semicuantitativa fueron realizados a partir de RNAs extraídos de diferentes tejidos. P, plántula; R, raíces; HR, hojas de roseta; TP, tallo principal; HC, hojas caulinares; YF, yemas florales y F, flores de Col cultivadas durante 25 días en condiciones de DL. Los productos de RT-PCR se hibridaron con sondas específicas de los genes *YAF9A* y *YAF9B*. Se utilizó la expresión de *UBQ10* como control de carga.

A continuación, para analizar en detalle el patrón de expresión del gen *YAF9A*, generamos plantas transgénicas en fondo Col, que expresan una fusión transcripcional de una región de 1Kb del promotor de *YAF9A* con el gen delator *GUS* (*YAF9Ap::GUS*). Analizamos aproximadamente 15 líneas transgénicas independientes, de las cuales seleccionamos tres líneas homocigotas estables, portadoras de una única inserción del

transgén, y determinamos la expresión del gen reportador *GUS* en distintos órganos y en distintos estadios del desarrollo de la planta. Como se muestra en la figura 50, en plantas cultivadas durante 7 días, la expresión del gen delator es mayor en tejidos que se dividen activamente como cotiledones, el meristemo apical de la raíz y los primordios de raíces laterales (Fig. 50 a,b,d,e). Además, en plantas cultivadas durante dos semanas, también se aprecia la expresión del gen *GUS* en las primeras hojas verdaderas (Fig. 50c). La expresión de *YAF9Ap::GUS* se mantiene en estadios posteriores del desarrollo, siendo particularmente elevada en anteras (Fig. 50g, h). Por lo tanto, podemos concluir que *YAF9A* muestra un patrón de expresión ubicuo, expresándose en todos los órganos de la planta en los diferentes estadios del desarrollo analizados. Estas observaciones concuerdan con los datos de expresión disponibles para *YAF9A* en las bases de datos de expresión, públicas como el “Arabidopsis eFPBrowser” (Winter et al., 2007):

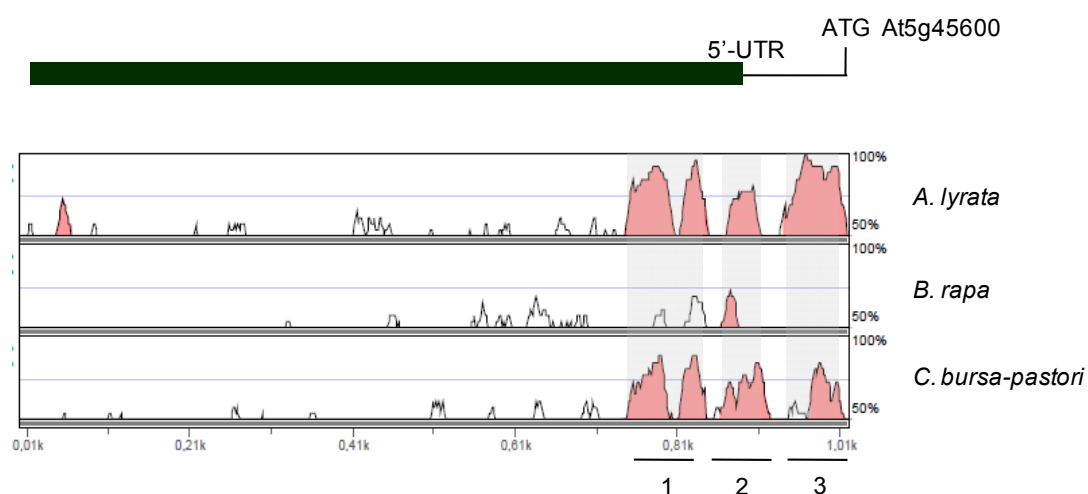
<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?primaryGene=AT5G45600&modelInput=Absolute>

El patrón de expresión general, observado para *YAF9A* es consistente con la idea de que este gen pueda estar implicado en el control de diversos procesos del desarrollo de la planta, participando en la regulación de la expresión génica mediada por los complejos SWR1 y NuA4 de Arabidopsis.



**Fig. 50. Análisis de expresión dependiente del promotor del gen *YAF9A* fusionado al gen reportador *GUS*.** Los patrones de expresión de *YAF9A* fueron examinados mediante tinción histoquímica de *GUS* realizada en plantas transgénicas *YAF9Ap::GUS* cultivadas durante (a-b y d-e) 7, (c) 13, (f-g) 25, y (h-i) 43 días en cotiledones, hojas de roseta, raíces laterales, raíz principal, anteras, región del meristemo apical, flores y silicua.

Una vez analizado el patrón de expresión del gen *GUS* en plantas transgénicas *YAF9Ap::GUS/Col*, nos propusimos determinar la presencia de regiones conservadas en el promotor de *YAF9A*, que pudieran explicar su expresión en los distintos tejidos de la planta, o la posible respuesta de este gen tanto a factores ambientales como endógenos. Para ello, realizamos un estudio comparativo de una secuencia de aproximadamente 1Kb de la región promotora de *YAF9A*, por encima del codón de iniciación, con las secuencias promotoras de genes *YAF9A* presentes en diferentes especies de *Brassicaceas*. Para este análisis utilizamos el programa informático mVISTA: <http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>. (Mayor et al., 2000; Frazer et al., 2004)



**Fig. 51. Comparativa de secuencias reguladoras en la región promotora del gen *YAF9A* en *Arabidopsis thaliana* con las de ortólogos presentes en diferentes especies de la familia *Brassicaceae*.** (A) Representación de la secuencia nucleotídica de la región promotora (caja negra) y 5'UTR del gen *YAF9A*. El ATG al final de la secuencia representa el codón iniciación. (B) Representación mediante el programa mVISTA de la homología existente entre cada una de las secuencias promotoras de *YAF9A* ortólogas en *Arabidopsis lyrata* (*A. lyrata*), *Brassica rapa* (*B. rapa*) y *Capsella bursa-pastori* (*C. bursa-pastori*) comparadas con la secuencia promotora de *YAF9A* en *A. thaliana*. Las regiones sombreadas en rosa indican la presencia de regiones de 25pb con más de un 70% de homología entre las secuencias analizadas.

El análisis comparativo de la región promotora de *YAF9A* de *Arabidopsis thaliana*, frente a las regiones promotoras de los ortólogos de dicho gen, presentes en *Arabidopsis lyrata*, *Brassica rapa* y *Capsella bursa-pastori*, reveló la existencia de tres regiones conservadas, próximas al inicio de la transcripción, que representamos en la figura 51 mediante las regiones sombreadas en rosa, 1, 2 y 3. El estudio de las secuencias contenidas en estas regiones mostró la presencia de varios elementos reguladores. A lo largo de la región 1, se identificaron varias secuencias de reconocimiento tipo MYC (CANNTG), similares a las presentes en promotores de genes

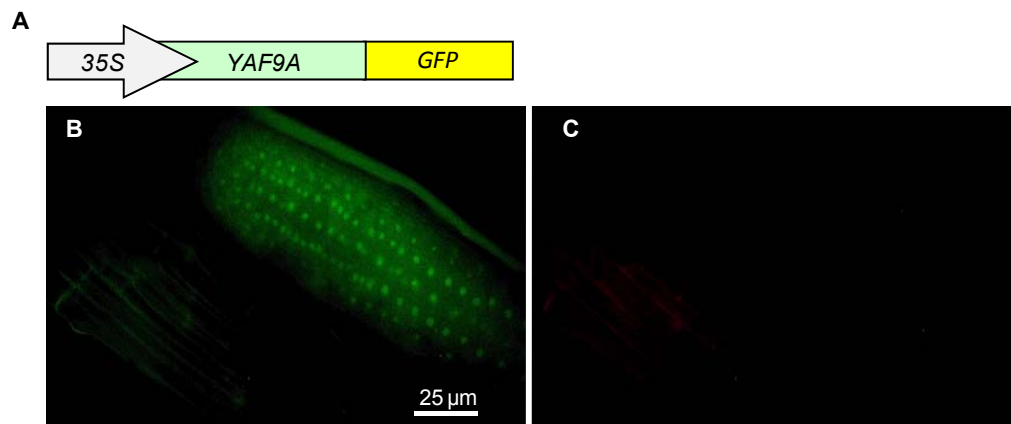
implicados en la respuesta a estrés hídrico. También se localizaron varios elementos “I-box” (GATAAG), muy conservados en promotores de genes regulados por luz, que se repiten en la región 2 del promotor de *YAF9A*. En la región 1 también se identifica un motivo GTGA y otros elementos reguladores responsables de la activación de genes específicos de polen. Finalmente, contenida en la región 1, identificamos dos secuencias de unión “GATA-box” que también se repiten en la región 2 y que se encuentra en elementos regulados por luz y en proteínas relacionadas con la unión de clorofila. En la región 2, además de los elementos que se repiten en la región 1, se localizan varias secuencias de unión de proteínas MYB (CNGTTR, AACGG), frecuentemente relacionadas con la regulación de genes de respuesta a estrés hídrico y en la síntesis de flavonoides, así como un motivo específico de promotores de genes activados en células infectadas de los nódulos de raíz.

Por último en la región 3 del promotor de *YAF9A*, más cercana al codón de iniciación, se repiten de nuevo varios elementos relacionados con la expresión de genes específico de polen y se localizan varias secuencias de unión del factor GT-1 (GRWAAW, GAAAAA, GTGA), una proteína relacionada con la respuesta a luz, que también participa en la regulación de genes inducidos por ácido salicílico, relacionados con la respuesta SAR. Además, esta región contiene dos elementos “W-box” (TGACY) localizados en los promotores de genes represores de la transcripción, como *WRKY71*, un represor transcripcional de la ruta de señalización por GA y otras proteínas WRKY relacionadas con la respuesta de defensa frente a patógenos. Todos los elementos conservados en el promotor de *YAF9A* se encuentran presentes en genes que se expresan generalmente en hojas y en tejidos que se dividen activamente, y sumados a los elementos específicos de polen, explicarían el patrón de expresión observado en las plantas transgénicas *YAF9Ap::GUS/Col*.

En levaduras, Yaf9 forma parte de complejos remodeladores de cromatina implicados en la regulación de la expresión génica, que funcionan en el núcleo celular. Con el objeto de determinar si la localización subcelular de la proteína *YAF9A* en *Arabidopsis*, también es nuclear, generamos plantas transgénicas en fondo Col, que expresan una fusión de *YAF9A* con la proteína GFP por su extremo C-terminal, bajo el control del promotor 35S. Analizamos alrededor de 20 líneas transgénicas *35S::YAF9A-GFP/Col* y seleccionamos tres líneas homocigotas independientes, con una única inserción de la construcción. Como se muestra en la figura 52, mediante el análisis por microscopía confocal de fluorescencia, de las raíces de estas plantas, pudimos observar que *YAF9A* se localiza preferentemente en el núcleo de las células. Esta observación es



consistente con la implicación de YAF9A en la regulación de la expresión génica y su posible participación en los complejos SWR1 y NuA4.

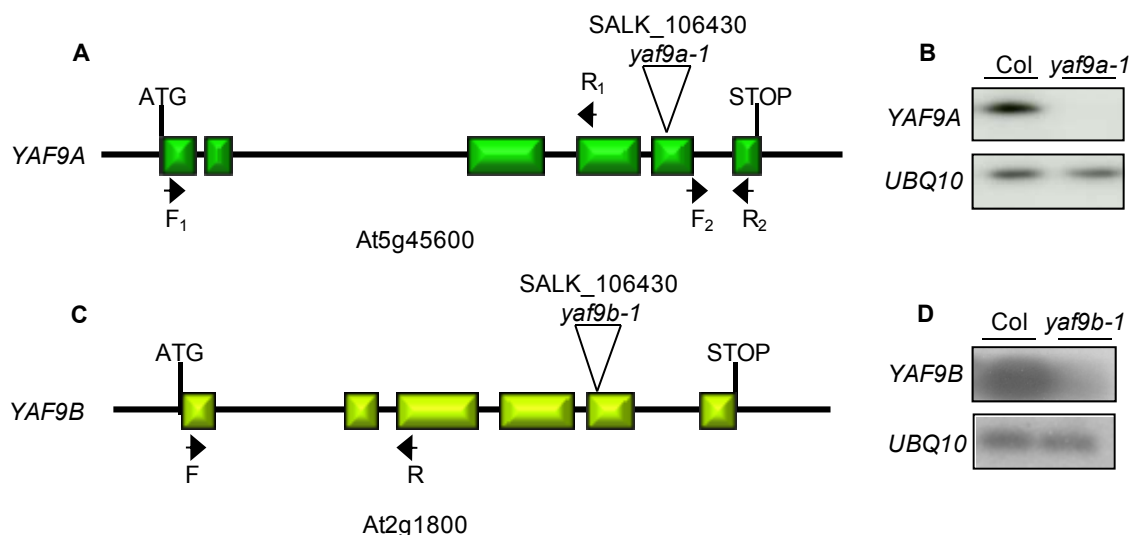


**Fig. 52. Localización subcelular de la proteína de fusión YAF9A-GFP en plantas transgénicas de Col.** (A) Esquema de la construcción 35S::YAF9A-GFP usada para transformar plantas Col. (B) Imagen de la raíz principal de una planta transgénica 35S::YAF9A-GFP, donde se observa la expresión de YAF9A-GFP en el núcleo de las células (C) Imagen de la autofluorescencia emitida por las células presentes en la misma sección de la raíz principal de estas plantas. Estas plantas fueron cultivadas *in vitro*, en placas verticales, en condiciones de DL durante 15 días. Las imágenes de microscopía confocal fueron tomada con un microscopio modelo Leica SP2 y analizadas mediante el software Leica LCS Lite.

Por tanto, los análisis realizados del patrón de expresión de los genes *YAF9A* y *YAF9B* indican que ambos genes se expresan en todos los tejidos analizados, aunque de forma mayoritaria en raíz, flores y yemas florares de plantas de *Arabidopsis*. Por su parte, la región promotora de *YAF9A* dirige la expresión del gen delator *GUS* a diferentes órganos de la planta, en distintos estadios del desarrollo, revelando un patrón de expresión predominante en tejidos que se dividen activamente como en el meristemo radicular, en anteras y en polen de plantas transgénicas *YAF9Ap::GUS/Col*. Finalmente, los datos obtenidos a partir del análisis de microscopía confocal de plantas transgénicas portadoras de la construcción 35S::YAF9A-GFP mostraron que la proteína YAF9A-GFP se localiza de forma preferente en el núcleo de las células. Estos datos coinciden con la posible participación de YAF9A en diversos complejos remodeladores de cromatina presentes en el núcleo, que podrían estar implicados en la regulación de múltiples aspectos del desarrollo de la planta.

### 3.3. Caracterización fenotípica de los mutantes de pérdida de función de *YAF9A* y *YAF9B*

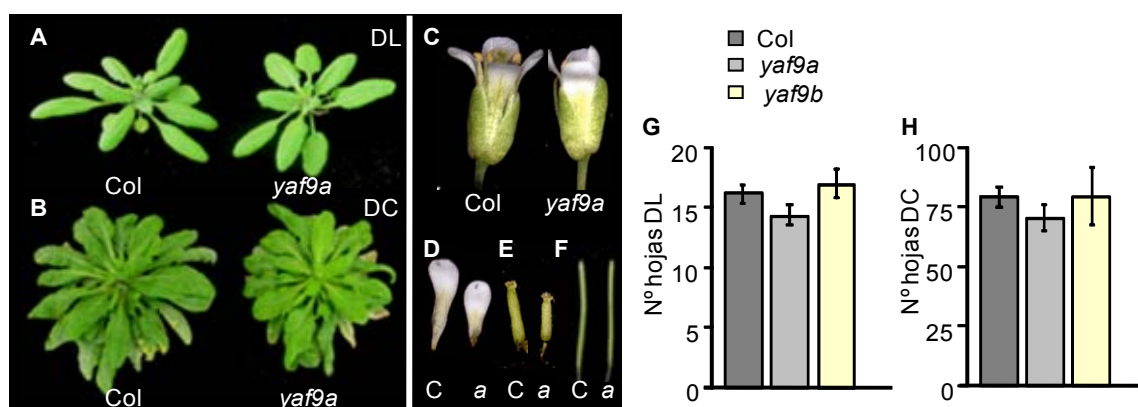
Para profundizar en la función que desempeñan los genes *YAF9A* y *YAF9B* en el control de diferentes procesos del desarrollo de *Arabidopsis* y en concreto, en la regulación de la transición floral, hemos identificado líneas portadoras de inserciones de T-DNA en dichos genes. Para el locus At5g45600 que corresponde a *YAF9A* identificamos la línea de inserción SALK\_106430, de la colección desarrollada por Alonso y colaboradores (Alonso et al., 2003), y que hemos designado como *yaf9a-1*. Dicha línea presenta una inserción de T-DNA en el quinto exón del gen, en la posición correspondiente al nucleótido 1317 de la región codificante (Fig. 53A). En paralelo, hemos identificado otra línea de T-DNA de la misma colección, la línea SALK\_046223, para el locus At2g18000, *YAF9B*, que hemos designado como *yaf9b-1*. Esta línea presenta una inserción de T-DNA en la posición 1138pb de la región codificante, interrumpiendo la secuencia génica en el quinto exón del locus (Fig. 53C).



**Fig. 53. Aislamiento de alelos de pérdida de función para los genes *YAF9A* y *YAF9B*.** (A) Estructura genómica de *YAF9A* constituido por 6 exones representados mediante cajas verdes. La localización de la inserción de T-DNA de la línea designada *yaf9a-1* se indica mediante un triángulo invertido en la posición correspondiente al nucleótido 1317 de la región codificante. (B) Análisis de RT-PCR semicuantitativa que muestra los niveles de expresión del mRNA de *YAF9A* y (D) de *YAF9B*, en plantas silvestres y mutantes *yaf9a-1* y *yaf9b-1*, respectivamente, cultivadas en DL. Usamos como control de estos experimentos, la expresión del gen *UBQ10*. (C) Estructura genómica del gen *YAF9B* constituido por 6 exones representados mediante cajas de color verde claro. El triángulo invertido indica la localización de la inserción de T-DNA en el quinto exón del gen, en la línea designada como *yaf9b-1*. La línea negra representa los intrones y regiones 5' y 3' UTR de los genes *YAF9A* y *YAF9B*. Las flechas hacen referencia a los cebadores directo (F) y reverso (R) utilizados para generar las sondas empleadas para analizar la expresión de *YAF9A* y *YAF9B* (Tabla 8).

Mediante análisis de RT-PCR semicuantitativa y usando cebadores específicos localizados por encima de la inserción de T-DNA (Tabla 8), comprobamos que en plantas homocigotas tanto para la mutación *yaf9a-1* como para la mutación *yaf9b-1*, no se detectó expresión de los mRNAs de *YAF9A* ni de *YAF9B* (Fig. 53B y D). Estos datos fueron corroborados mediante experimentos de qPCR, donde se muestran que tanto las plantas mutantes *yaf9a-1* como *yaf9b-1* no presentan niveles detectables de expresión de *YAF9A* o *YAF9B* (Fig.55; Tabla 9).

A continuación, realizamos un estudio de posibles alteraciones fenotípicas presentes en estos mutantes, comparándolos con plantas silvestres. A partir de este análisis observamos que el mutante *yaf9a* presentaba una ligera aceleración en el tiempo de floración, según el número total de hojas de roseta y caulinares producidas en el momento de la emergencia del tallo floral (Fig. 54G-H). Analizando otras características del fenotipo de plantas *yaf9a* comprobamos que estos mutantes presentaban un porte menor que las plantas de tipo silvestre y producían flores más pequeñas, con pétalos y un gineceo, más pequeños (Fig. 54C-E). También las silicuas producidas por el mutante *yaf9a* presentaban una ligera reducción de la longitud en comparación con Col (Fig. 54F). Por otro lado, aunque presenta una roseta de tamaño similar a la de una planta silvestre, los mutantes *yaf9a* muestran un claro amarilleamiento de la misma y síntomas de clorosis (Fig. 54B). Por su parte, en el mutante *yaf9b* no se observó ninguna alteración fenotípica en comparación con Col, tampoco para el tiempo de floración (Fig. 54G-H).

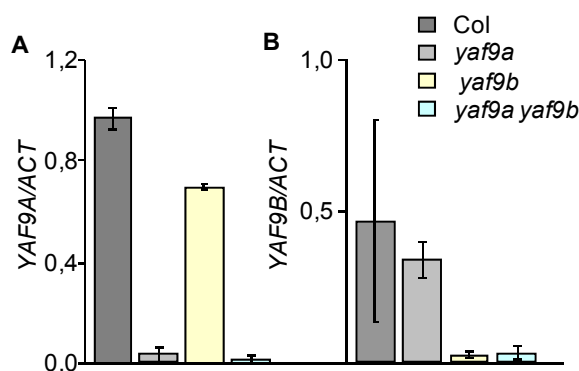


**Fig. 54 Caracterización fenotípica de plantas mutantes *yaf9a-1*.** (A) Plantas de Col y *yaf9a*, cultivadas en DL durante 15 días y (B) en DC durante 85 días. (C) Imagen de una flor de plantas Col y de *yaf9a*. (D) Diferencia de tamaño de pétalos y (E) gineceo del mutante *yaf9a*, respecto a la planta silvestre Col. (F) Silicuas de plantas silvestres Col (C) y de *yaf9a* (a). (G) Cuantificación del tiempo de floración, medido en número de hojas totales de los distintos genotipos en condiciones de DL y (H) en DC.

Por tanto, la mutación de *YAF9B* en *Arabidopsis* no parece alterar ningún aspecto del desarrollo de la planta, mientras que la mutación de *YAF9A* acelera ligeramente el tiempo de floración y afecta a otros aspectos de la planta, como el tamaño en general. Dada la homología de secuencia que existe entre ambas proteínas *YAF9*, con patrones de expresión similares, generamos dobles mutantes *yaf9a yaf9b*, con el fin de determinar la posible existencia de redundancia funcional entre ambos genes *YAF9*.

### 3.3.1. Análisis de las alteraciones fenotípicas causadas por la pérdida de función simultánea de *YAF9A* y de *YAF9B*

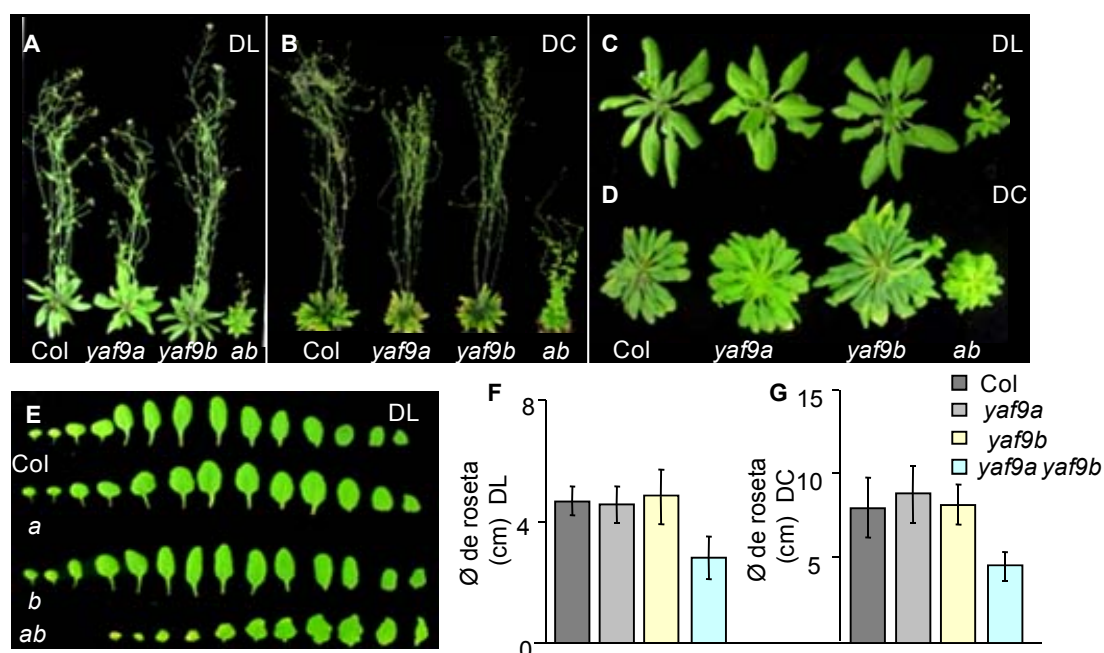
Mediante el establecimiento de una población F2 resultante del cruce de plantas *yaf9a* y *yaf9b*, y el seguimiento de la segregación de las inserciones de T-DNA en homocigosis mediante PCR, aislamos plantas dobles mutantes *yaf9a yaf9b* y confirmamos mediante aproximaciones de qPCR la ausencia de expresión de ambos genes (Fig. 55).



**Fig. 55. Análisis de la expresión de los genes *YAF9A* y *YAF9B* en plantas dobles mutantes *yaf9a yaf9b*.** (A) Análisis mediante qPCR que muestra los niveles de expresión del RNA mensajero de *YAF9A* y (B) *YAF9B*, en plantas Col, *yaf9a-1*, *yaf9b-1* y *yaf9a yaf9b*, cultivadas bajo fotoperiodos de DL durante 25 días. Usamos como control de este experimento la expresión del gen  $\beta$ -*ACT1*.

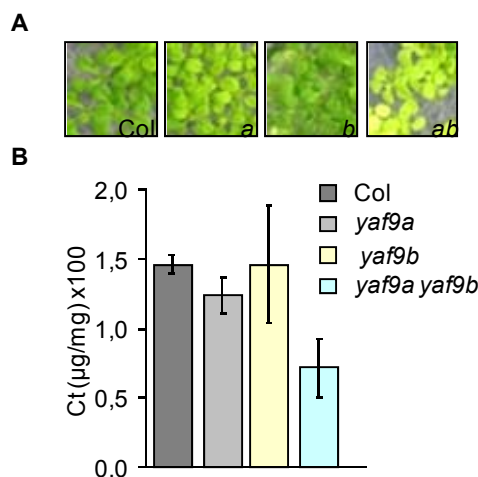
Como se observa en la figura 56 (A-B), la combinación en homocigosis de ambas mutaciones *yaf9a* y *yaf9b*, origina una planta de menor porte que cualquiera de los mutantes sencillos con alteraciones fenotípicas muy pleiotrópicas. Dichas plantas dobles mutantes muestran un acortamiento de los entrenudos, pérdida de la dominancia apical del meristemo y una drástica reducción del tamaño de la roseta tanto en condiciones de DL como en DC, respecto al fenotipo de la planta silvestre (Fig. 56F-G). Las hojas de roseta de los mutantes *yaf9a yaf9b* presentan alteraciones en su morfología, siendo éstas más pequeñas y con forma lanceolada. Estas hojas también presentan un fuerte

rizamiento de los bordes y un color más amarillo, desarrollando síntomas de clorosis, al igual que ocurría en plantas *swc4i* (Fig.36C y 57A).



**Fig. 56. El doble mutante *yaf9a yaf9b* presenta alteraciones pleiotrópicas del fenotipo.** (A) Plantas de *Col*, *yaf9a*, *yaf9b* y *yaf9a yaf9b*, cultivadas en DL durante 40 días y (B) en DC durante 120 días. (C) Plantas de *Col*, *yaf9a*, *yaf9b* y *yaf9a yaf9b*, cultivadas en condiciones de DL durante 20 días y (D) en DC durante 87 días. (E) Hojas de roseta y primera caulinar de los distintos genotipos cultivados en condiciones de DL, durante 30 días. Todas las hojas, incluidos los cotiledones, se presentan en orden de producción. (F y G) Cuantificación del diámetro de la roseta de los distintos genotipos cultivados, en condiciones en DL y DC, respectivamente.

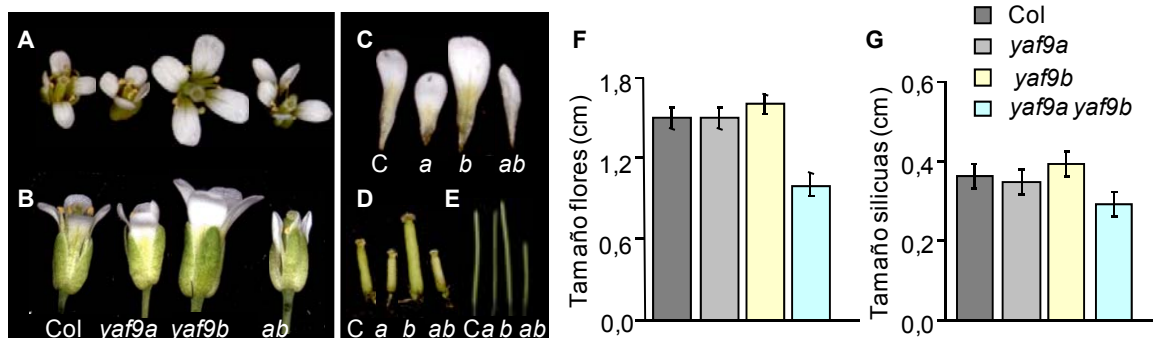
Con el fin de determinar si la clorosis observada en las hojas de plantas *yaf9a yaf9b* correspondía con una disminución en el contenido de clorofilas de las mismas, cuantificamos la cantidad de clorofilas totales presentes en dichas plantas y en los mutantes sencillos. Como se observa en la figura 57, la cantidad de clorofilas totales presente en el doble mutante *yaf9a yaf9b* se reducía en torno al 50%, si lo comparamos con los niveles determinados en plantas *Col* (Fig. 57B). De igual manera, en el mutante *yaf9a* se pudo observar una reducción significativa en la cantidad de clorofilas, aunque esta se producía en menor medida (en torno al 15% respecto a las clorofilas determinadas en plantas *Col*). Sin embargo, en el mutante *yaf9b* no se apreciaron cambios significativos para el contenido de clorofilas totales (Fig. 57B).



**Fig. 57. El mutante *yaf9 yaf9b* presenta una importante reducción en el contenido de clorofilas totales.** (A) Imágenes de plántulas Col, *yaf9a* (a), *yaf9b* (b) y *yaf9a yaf9b* (ab), cultivadas *in vitro*. (B) Medida de la concentración de clorofilas en µg por mg de tejido de los distintos genotipos, cultivados en condiciones de DL, durante 9 días en medio MS. La extracción de clorofilas se llevó a cabo según el método descrito por Moran y Porath, 1980.

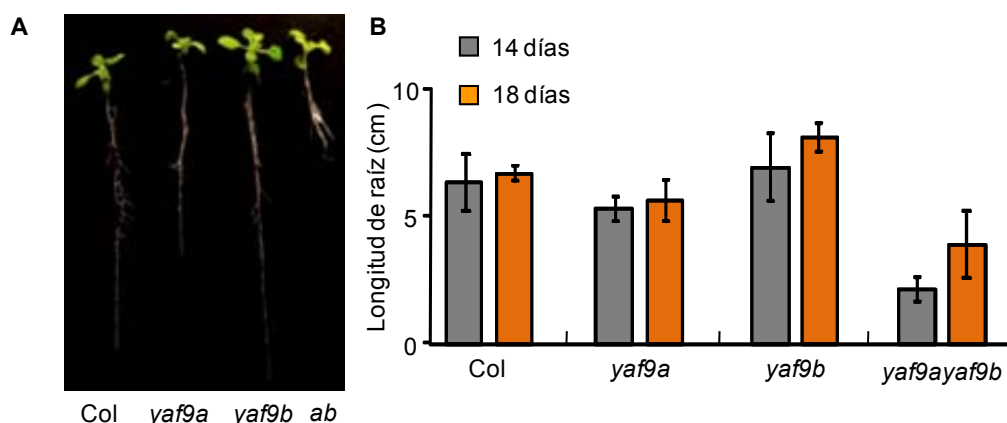
Otra de las alteraciones fenotípicas presentes en plantas *yaf9a yaf9b* es la reducción del número de flores (Fig.56A y B). Estas flores presentan un tamaño menor y muestran una desorganización en la disposición de los pétalos (Fig.58A-B y F). Tanto los pétalos como los carpelos de las flores del doble mutante son más pequeños que los de la planta silvestre, características que ya se podían observar en el mutante *yaf9a* y que se acentúan en el doble mutante (Fig. 54 y 58C-D). Las silicuas producidas por *yaf9a yaf9b* también muestran un tamaño reducido respecto a las silicuas de Col (Fig. 58E y G).

Es interesante resaltar que particularmente las primeras flores de la inflorescencia presentes en el mutante *yaf9b*, muestran un incremento del tamaño (Fig. 58A-B), si bien la cuantificación del tamaño medio de estas flores en plantas *yaf9b* no revela cambios significativos respecto de las flores de plantas Col y de *yaf9a* (Fig. 58F).



**Fig. 58. Caracterización morfológica de las flores de plantas *yaf9a yaf9b*.** (A) Disposición de los órganos florales en la flor de plantas Col, *yaf9a*, *yaf9b* y del doble mutante *yaf9ayaf9b*. (B) Imagen de la flor mostrando la diferencia de tamaño entre los distintos genotipos. (C) pétalos; (D) carpelos y (E) silicuas de plantas silvestres Col, mutantes *yaf9a*, *yaf9b* y doble mutante *yaf9a yaf9b*. (F) Cuantificación de la longitud de la flor, de plantas de los mutantes sencillos y del doble mutante, en condiciones de DC, comparado con las de plantas silvestres. (G) Cuantificación del tamaño de las silicuas de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DC.

Analizando otras alteraciones fenotípicas ocasionadas por la pérdida de función conjunta de los genes *YAF9* de *Arabidopsis*, pudimos determinar que las plántulas *yaf9a yaf9b* cultivadas bajo condiciones de DL, presentan una fuerte reducción en la elongación de la raíz principal, respecto a la raíz de las plántulas silvestres (Fig. 59). Igualmente, el mutante *yaf9a* también muestra una reducción en la longitud de la raíz, aunque menos pronunciada que la observada en plántulas dobles mutantes. En el caso del mutante *yaf9b*, no se observaron cambios significativos en el tamaño de la raíz principal, siendo muy similar al tamaño desarrollado por la raíz de plántulas Col.

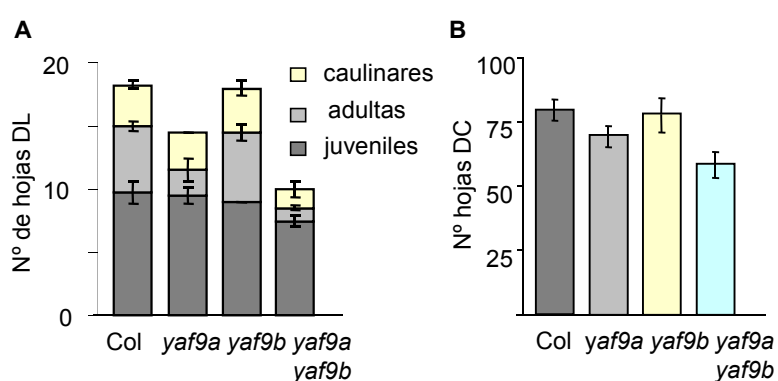


**Fig. 59. El doble mutante *yaf9a yaf9b* presenta una reducción en la elongación de la raíz principal.** (A) Plántulas Col, *yaf9a*, *yaf9b* y *yaf9a yaf9b*, cultivadas *in vitro* en placas de MS verticales, bajo fotoperiodo de DL, durante 15 días. (B) Medida de la longitud de la raíz principal de 15 plántulas de cada genotipo, cultivadas durante 14 y 18 días en medio MS.



Los mutantes *yaf9a yaf9b* presentan además, un fenotipo de floración alterado, ya que producen un menor número de hojas en el momento de la emergencia del tallo floral, reducción que se hace más pronunciada en condiciones de DC (Fig. 60A-B). Estos datos indican que el doble mutante *yaf9a yaf9b* presenta un fenotipo de floración temprana, similar al desarrollado por otros mutantes afectados en el complejo SWR1 (Noh y Amasino, 2003; Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008).

Dado que los mutantes *yaf9a yaf9b* muestran una aceleración del tiempo de floración, reduciendo así la duración del desarrollo vegetativo, decidimos cuantificar el número de hojas juveniles, adultas y caulinares en el doble mutante cultivado en DL, para determinar las fases del crecimiento vegetativo que podrían estar afectadas por la ausencia conjunta de ambos genes. Como puede observarse en la figura 60A, el mutante *yaf9a* muestra una reducción en el número de hojas adultas, pero no presenta cambios en el número de hojas juveniles y caulinares, mientras que el mutante *yaf9b* no muestra alteraciones significativas en el número de hojas correspondiente a cada fase del desarrollo vegetativo. Por su parte, el doble mutante *yaf9a yaf9b* presenta una reducción en la cuantificación de todos los tipos de hojas analizadas, si bien ésta es más notable para el número de hojas adultas y caulinares. Este aspecto del desarrollo de vegetativo observado en plantas *yaf9a yaf9b* podría explicarse por un efecto redundante de ambas proteínas en el control de estas transiciones de fase del desarrollo y sugiere un papel clave de estos genes parálogos en la represión de la floración en *Arabidopsis*.



**Fig. 60. El mutante *yaf9a yaf9b* florece más temprano y presenta alteraciones en la duración de las etapas del desarrollo vegetativo.** (A) Cuantificación del número de hojas juveniles, adultas y caulinares de plantas Col, *yaf9a*, *yaf9b* y *yaf9a yaf9b*, cultivadas en DL durante 22 días, según la morfología de las hojas y la distribución de los tricomas en las hojas de roseta. (B) Cuantificación del tiempo de floración, medido en número de hojas totales, de los distintos genotipos analizados en condiciones de DC.

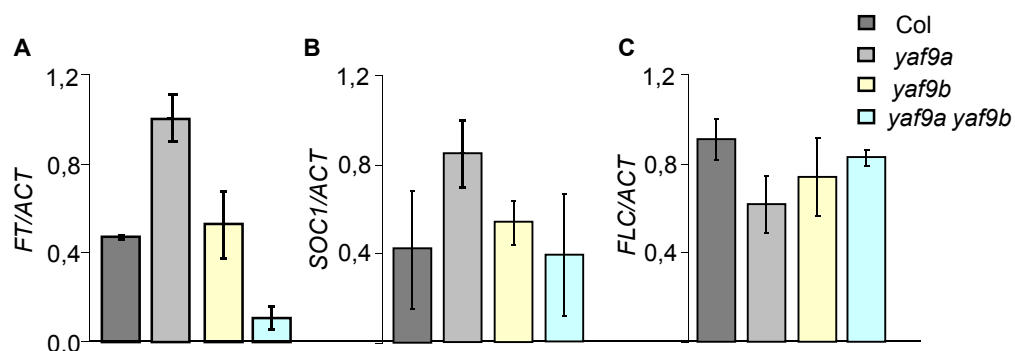


Por tanto, la ausencia de función simultánea de los genes *YAF9A* y *YAF9B*, conduce a una fuerte reducción del tamaño de la planta en general, y de los órganos vegetativos, florales y silicuas, en particular. Los dobles mutantes *yaf9a yaf9b* presentan un fenotipo de floración temprana y muestran una clara reducción de la duración de la fase adulta del desarrollo vegetativo, características que también son visibles en el mutante *yaf9a*. Por el contrario, en el mutante *yaf9b* no se aprecian diferencias visibles en su fenotipo respecto al parental silvestre. Todas estas observaciones indican que *YAF9A* y *YAF9B* tienen funciones, al menos, parcialmente redundantes en el control de diferentes procesos del desarrollo en *Arabidopsis*. De hecho, *YAF9A* y *YAF9B* participan de forma conjunta en la represión de la floración, ya que la pérdida simultánea de la función de ambos genes potencia el fenotipo de floración temprana de *yaf9a* y origina diferentes alteraciones fenotípicas en el doble mutante, que no se manifestaban en los mutantes sencillos *yaf9a* y *yaf9b*.

### 3.3.2. Análisis de expresión de genes de floración en mutantes *yaf9a yaf9b*

En estudios anteriores se ha demostrado que otros mutantes del complejo SWR1 como *pie1*, *swc6* y *esd1*, muestra un aumento de la expresión de *FT* y *SOC1* y una disminución en los niveles de *FLC*, corroborando el fenotipo de floración temprana observado en estos mutantes (Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008). Por esta razón, analizamos si el fenotipo de floración temprana que muestran los mutantes *yaf9a yaf9b*, se debía igualmente, a cambios en la expresión de genes implicados en el control de la transición floral. Para ello, realizamos experimentos de qPCR y analizamos los niveles de expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1*, así como del represor floral *FLC* en plantas Col, *yaf9a*, *yaf9b* y en el doble mutante *yaf9a yaf9b*, cultivadas bajo condiciones de DL durante 11 días (Fig. 61).

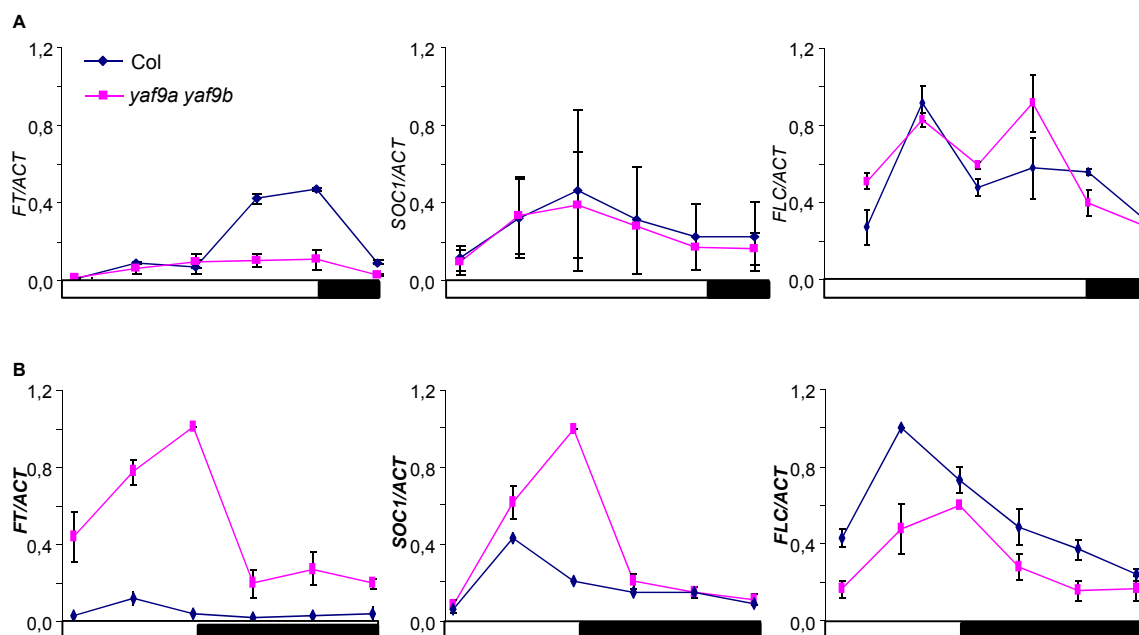
Como se puede observar en la figura 61, los niveles de expresión de *FT* de muestras tomadas al final del día, aumentan en plantas *yaf9a*, dato que concuerda con el aumento de la expresión de *SOC1*, y es consistente con el fenotipo de floración ligeramente temprano de estos mutantes en DL. El descenso observado en la expresión de *FLC* también corrobora el fenotipo temprano del mutante *yaf9a* (Fig 61).



**Fig. 61. Análisis de la expresión de genes de floración en plantas *yaf9a yaf9b*.** Se llevaron a cabo aproximaciones de qPCR con muestras de RNA extraído de plantas Col, *yaf9a*, *yaf9b* y *yaf9a yaf9b* cultivadas durante 11 días, en DL. (A) Determinación de los niveles de expresión de *FT*, en ZT16 (B) de *SOC1* en ZT8 y (C) de *FLC* en ZT16. La hora ZT0 corresponde al inicio del periodo de iluminación. Como control de este experimento, se utilizó la expresión del gen  $\beta$ -*ACT1*, y la expresión de los genes problema se normalizó frente a la expresión de dicho gen.

Por su parte, en los mutantes *yaf9b* la expresión de los genes de floración no parece estar alterada, lo que coincide con la ausencia de alteraciones en el fenotipo de floración en estos mutantes (Fig. 60 y 61). Finalmente, en las plantas *yaf9a yaf9b* se observa una pequeña disminución en los niveles de expresión del represor *FLC* respecto a Col. Aunque esta reducción en la expresión de *FLC* en mutantes *yaf9a yaf9b* es considerablemente menor que la mostrada en plantas *yaf9a*, apoya el fenotipo de floración temprana observado en los dobles mutantes cultivados en condiciones de DL. Por el contrario, a diferencia de lo que ocurre en mutantes *yaf9a*, en el doble mutante *yaf9a yaf9b* estos niveles de *FLC* no van acompañados de un aumento en la expresión de *FT* y *SOC1*, lo que sugiere que el fenotipo de floración temprana del doble mutante no estaría asociado a la sobreexpresión de estos integradores florales.

A partir de estas observaciones y con el fin de corroborar los datos de expresión de los genes *FT*, *SOC1* y *FLC* en plantas *yaf9a yaf9b*, decidimos realizar un análisis de expresión temporal de dichos genes, a lo largo del día, en el doble mutante, en condiciones de DL y DC, tomando muestras cada 4 horas (Fig. 62). Todos los datos obtenidos del análisis de expresión fueron calculados a partir de tres réplicas biológicas independientes, realizadas en las mismas condiciones de cultivo.



**Fig. 62. Análisis de la expresión, a lo largo del día, de los genes *FT*, *SOC1* y *FLC* en plantas mutantes *yaf9a yaf9b*.** (A) Análisis mediante qPCR de plantas Col y *yaf9a yaf9b*, cultivadas durante 11 días en condiciones de DL y (B) 19 días en condiciones de DC. Las muestras fueron recogidas cada 4 horas, durante 24 horas. La hora ZT0 corresponde al inicio del periodo de iluminación. Usamos como control de este experimento la expresión del gen  $\beta$ -ACT1.

Según los datos recogidos en la figura 62, a pesar de que el doble mutante *yaf9a yaf9b* presenta un claro fenotipo de floración temprana en DL, y que produce aproximadamente 6 hojas menos respecto a la planta silvestre, los niveles de expresión de *SOC1* y *FLC* no cambian, e incluso se observa una disminución de la expresión de *FT* en las muestras tomadas al final del día (Fig. 62A). Por el contrario, en condiciones de DC, la expresión de estos genes coincide con el fenotipo de aceleración de la floración presente en *yaf9a yaf9b*, es decir, la expresión de los genes *FT* y *SOC1* es más elevada en el doble mutante, mientras que los niveles de expresión de *FLC* disminuyen respecto a la expresión observada en parental silvestre (Fig. 62B).

En ambos experimentos realizados en condiciones de DL, los niveles de expresión de los genes *SOC1* y *FLC* no cambiaron significativamente en plantas *yaf9a yaf9b* comparado con los datos observados en Col. Por su parte, los reducidos niveles de expresión de *FT* mostrados por el doble mutante no se corresponden con el fenotipo de floración temprana presente en estas plantas (Fig. 60-62A).

En fotoperiodos de DC, los niveles de expresión observados en plantas *yaf9a yaf9b* para *FT* y *SOC1* y para el represor *FLC*, sustentarían el fenotipo de floración temprana que presentan dichas plantas. Estos datos indican que ambos genes *YAF9* se requieren para activar la expresión de *FLC* o para reprimir la expresión de *FT* y *SOC1*, hasta que la planta se encuentra en las condiciones más óptimas para florecer. Por tanto, estas observaciones sugieren un papel para *YAF9* en la represión de la transición floral, al menos en condiciones de fotoperiodos no inductivos.

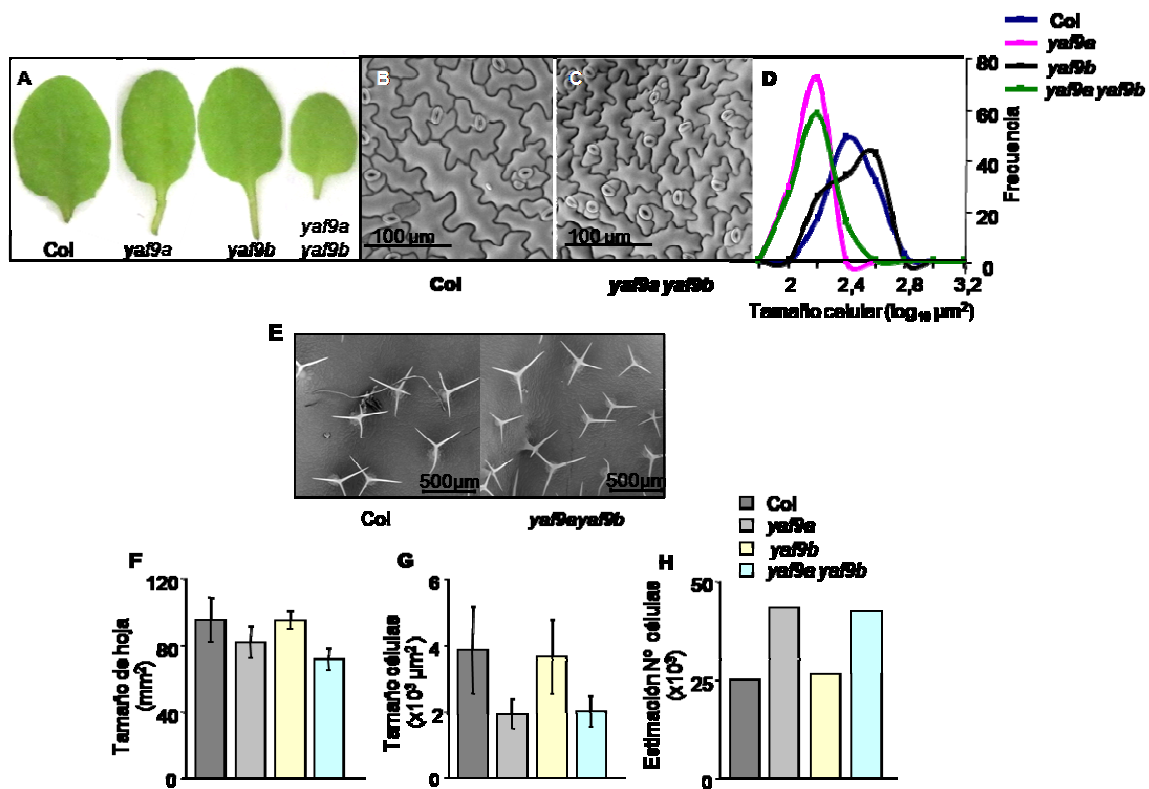
### **3.3.3. Análisis del tamaño y proliferación celular de plantas mutantes para *YAF9A* y *YAF9B***

Dada la reducción del tamaño observado en plantas *yaf9a yaf9b*, con una clara disminución en el tamaño de las hojas y flores, así como el acortamiento en la longitud de la raíz principal, nos propusimos estudiar la implicación de los genes *YAF9* en el control del tamaño y/o proliferación celular. En primer lugar, para determinar si la reducción en el tamaño de las hojas de plantas *yaf9a yaf9b*, así como el rizamiento de sus bordes, se podía deber a defectos en los procesos de división o de expansión celular, llevamos a cabo una serie de mediciones, de forma similar al análisis realizado con plantas *swc4i* (Fig.40). Todos estos datos se encuentran recogidos en la figura 63 y se obtuvieron mediante análisis microscópico de la tercera y cuarta hoja de la roseta, siguiendo protocolos ya descritos (Mathur et al., 2003; Ramírez-Parra et al., 2007). Para obtener datos homogéneos del tamaño celular y de la relación del número de células por área total de la hoja, se tomaron todas las muestras en condiciones de DC, a los 32 días de cultivo en tierra. Bajo dichas condiciones experimentales, observamos que tanto en plantas mutantes *yaf9a* como en plantas *yaf9a yaf9b*, el área de las células epidérmicas de la cara abaxial de la 3ª y 4ª hoja, disminuye aproximadamente a la mitad, respecto a las de las plantas silvestres. Sin embargo, este tipo de mediciones en plantas *yaf9b* no reveló variaciones significativas en el tamaño celular. Por su parte, el análisis del área total de la 3ª y 4ª hoja de la roseta mostró que las plantas mutantes *yaf9a* presentan una ligera reducción de la misma, aunque esta fue más acusada en las plantas *yaf9a yaf9b*, donde se apreciaron reducciones del área foliar en torno al 25% de lo observado en plantas silvestres (Fig. 63F). Tampoco se observaron cambios significativos en el tamaño de las hojas para el mutante *yaf9b*. Finalmente, calculamos la relación existente entre el número de células de la epidermis y el área total de la hoja en los distintos genotipos analizados. Estos cálculos revelaron que aunque en mutantes *yaf9a* y *yaf9a yaf9b*, el tamaño de las células y de las hojas es menor, el número de células por área total de la hoja aumenta respecto a la planta silvestre (Fig. 63H). Estas

características presentes en el mutante *yaf9a yaf9b* coinciden además, con la presencia de una mayor densidad de tricomas en la cara adaxial de la hoja, aunque el estudio de este fenotipo no se ha abordado en profundidad, ya que se extiende más allá de los objetivos inicialmente planteados en esta tesis.

Todos estos datos sugieren que estas alteraciones observadas en el doble mutante *yaf9a yaf9b*, son dependientes exclusivamente de la pérdida de función de *YAF9A*. Como se puede observar en la figura 63, este comportamiento está presente tanto en plantas *yaf9a* como en *yaf9a yaf9b*, sin embargo en el mutante *yaf9b* no se observan estas alteraciones fenotípicas y se comporta como una planta silvestre. En conclusión, se puede decir que la ausencia de función de *YAF9A* es la responsable de las alteraciones observadas a nivel celular y del tamaño de la hoja en las plantas *yaf9a* y en *yaf9a yaf9b* y por tanto, *YAF9B* no parece estar implicado en el control de estos procesos de desarrollo foliar o de expansión celular. Por último, de forma similar a lo observado en plantas *swc4i*, los mutantes *yaf9a* y *yaf9a yaf9b*, también podrían presentar alteraciones en la regulación de las distintas transiciones del ciclo celular.

Como ya se ha definido, los procesos de división celular y el endociclo, se encuentran acoplados para regular el desarrollo foliar (Ramírez-Parra et al., 2007). Y se ha asociado un mayor tamaño celular con el aumento del nivel de ploidía en estas células (Kondorosi et al., 2000; Larkins et al., 2001; Sugimoto-Shirasu y Roberts, 2003). Por esta razón, el menor tamaño de las hojas de roseta y del área de las células epidérmicas de las hojas de plantas *yaf9a yaf9b* podría explicarse como consecuencia de cambios originados en el balance entre la división celular y el endociclo, y podría estar asociado con una disminución de la ploidía de las células que conforman las hojas. Esta reducción en la expansión celular podría justificar también la existencia del rizamiento de los bordes de las hojas, característico del doble mutante *yaf9a yaf9b*. Para ello, decidimos cuantificar los niveles de ploidía en las células de las hojas de plantas *yaf9a yaf9b*, mediante análisis de citometría de flujo. En la figura 64 se muestran los datos obtenidos de estos análisis y se observan cambios en los niveles de ploidía de las células que forman la tercera y cuarta hoja de *yaf9a yaf9b*, particularmente en DC. Estos cambios también se pueden observar, aunque de forma menos pronunciada, en las hojas de roseta de dichas plantas, cultivadas durante 32 días, bajo condiciones de DL. Sin embargo, los análisis realizados a partir de los cotiledones de plántulas *yaf9a yaf9b* cultivadas *in vitro*, durante 20 días, en fotoperiodos de DL, no revelaron cambios significativos en la carga génica de las células que componen estos órganos (Fig. 64B).



**Fig. 63. Efecto de la pérdida de función de los genes YAF9A y YAF9B en el tamaño celular y foliar.** (A) Tamaño de la cuarta hoja de roseta de plantas Col, *yaf9a*, *yaf9b* y *yaf9a yaf9b*. (B-C) Imagen SEM de las células epidérmicas de la cara abaxial de la cuarta hoja de roseta de plantas (B) Col y (C) *yaf9a yaf9b* (200x). (D) Distribución según el tamaño de las células ( $\log_{10} \mu\text{m}^2$ ) de la epidermis en la cara abaxial de estas hojas. (E) Imagen SEM de la superficie foliar adaxial de una hoja de roseta, donde se muestra una mayor densidad de tricomas en *yaf9a yaf9b* respecto al Col. (F) Cuantificación del área foliar de hojas de roseta de los distintos genotipos, medidos en  $\text{mm}^2$ . (G) Cuantificación del área de células epidérmicas de la cara abaxial de hojas de roseta de los distintos genotipos. (H) Estimación del número de células epidérmicas presentes en la cara abaxial ( $\times 10^3$ ) de una hoja de roseta completa, en los distintos genotipos. Todos los datos de cuantificación del tamaño de hoja y del área celular se obtuvieron a partir de la tercera y cuarta hoja de los distintos genotipos cultivados en condiciones de DC durante 32 días.

Por tanto, en condiciones de fotoperiodos no inductivos, en las hojas de mutantes *yaf9a yaf9b* se produce un aumento del número de células que tienen un contenido de DNA 2C y 4C y un descenso en aquellas que contienen 8C y 16C, comparado con lo que se observa en las hojas de una planta Col (Fig. 64A). De la misma manera, los mutantes *yaf9a* cultivados en DC, muestran un aumento de las células que contienen una carga 4C y una reducción de aquellas que contienen carga 8C y 16C. En conjunto, estos datos indican una alteración en los niveles de ploidía de las células de mutantes *yaf9a* y *yaf9a yaf9b* durante el desarrollo en condiciones de DC (Fig. 64A-B). En condiciones de DL, los mutantes *yaf9a* no muestran cambios significativos en los niveles de ploidía de las células que forman tanto las hojas de roseta de plantas cultivadas

durante 32 días, como los cotiledones de plántulas cultivadas durante 20 días. En el caso de mutantes *yaf9b*, no se observan cambios en los niveles de ploidía para ninguna de las condiciones experimentales realizadas.

En definitiva, el aumento de las células que contienen carga génica 2C y 4C y el descenso del número de células con carga 8C y 16C, podría ser la consecuencia de una progresión al endociclo lentificada, lo que explicaría una reducción en la expansión celular (Ramírez-Parra et al., 2007). Estos datos justificarían el menor tamaño de las células y el mayor número de éstas por superficie foliar, observado en plantas *yaf9a* y *yaf9a yaf9b*, junto a una mayor densidad de tricomas.

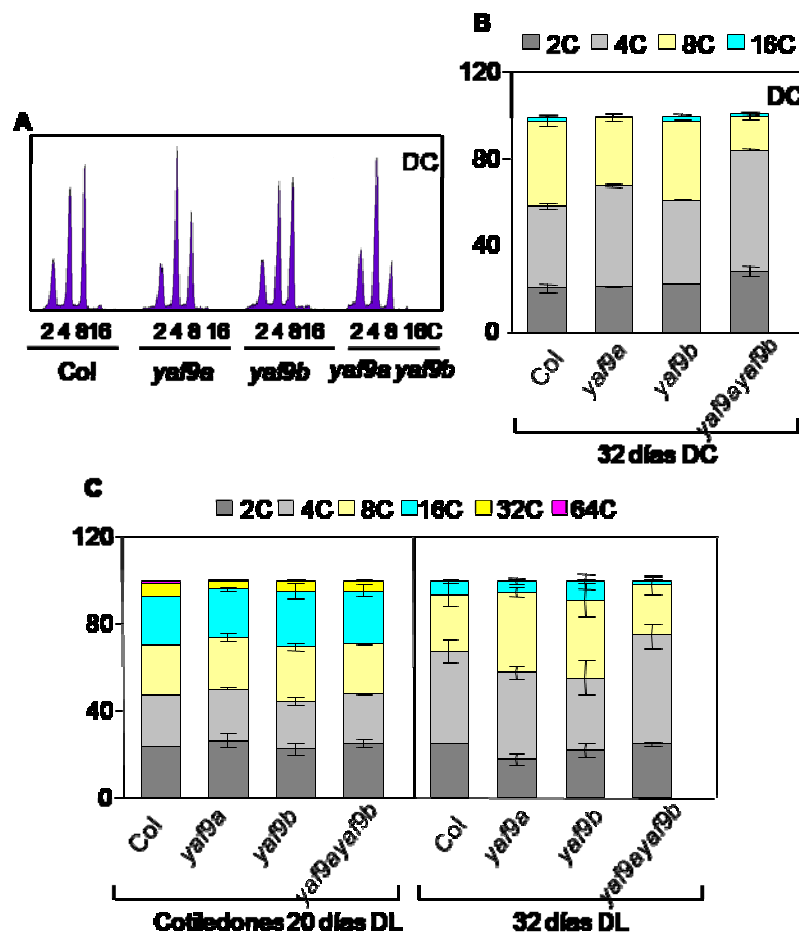


Fig. 64. Análisis de los niveles de ploidía mediante citometría de flujo de la 3ª y 4ª hoja de plantas *yaf9a yaf9b*. (A) Perfiles del contenido de DNA obtenidos de los distintos genotipos cultivados en condiciones de DC durante 32 días. (B) Cuantificación de las células con distinta cantidad de DNA nuclear, de plantas Col, *yaf9a-1*, *yaf9b-1* y *yaf9ayaf9b*, cultivadas en DC, durante 32 días. (C) Cuantificación de las células con distinta cantidad de DNA nuclear tanto de cotiledones cultivados durante 20 días, como de la 3ª y 4ª hoja de plantas cultivadas durante 32 días, en condiciones de DL, de los diferentes genotipos estudiados.

Concluyendo, todas estas observaciones sugieren que las hojas de las plantas *yaf9a* y del doble mutante *yaf9ayaf9b* presentan una reducción en la carga génica de sus células, que se produce por el retraso en la progresión hacia el endociclo, lo que a su vez explicaría el menor tamaño de las células epidérmicas y de las hojas en dichas plantas.

El hecho de que los dobles mutantes *yaf9a yaf9b* presenten mayor número de células por área foliar y que los niveles de ploidía de estas células estén disminuidos en condiciones de DC, nos llevó a preguntarnos si la ausencia de función de los genes *YAF9A* y *YAF9B* conducía a alteraciones en la expresión de genes reguladores de la progresión del ciclo celular.

A partir de los datos globales de expresión, obtenidos mediante el análisis transcriptómico de *yaf9a yaf9b*, comparados con el correspondiente parental silvestre, pudimos observar diferencias en la expresión de determinados genes reguladores de las distintas fases del ciclo celular (Tabla 11). Según se muestra en la tabla 11, los genes específicos de la replicación del DNA, como *ORC4* y *CDC6A* aumentan significativamente su expresión en plantas mutantes *yaf9a yaf9b* con respecto a Col (Castellano et al., 2001; Díaz-Trivino et al., 2005; Kawabe et al., 2005; Kurihara et al., 2006). Por su parte, también se observa disminuida la expresión de *CCS52A2*, un marcador propio de la endorreplicación (Lammens et al., 2008). Estos datos apoyarían nuestra hipótesis sobre la existencia de un aumento de la proliferación celular y sobre la inhibición de la entrada al endociclo en mutantes *yaf9a yaf9b* (Tabla 11).

Además, se encuentra desregulada la expresión de marcadores propios de mecanismos de reparación por recombinación homóloga de DNA (HR) y del punto de control en G2, como *PARP1*, *SMC6A* y *SMC6B* (Ramírez-Parra et al., 2007), cuya expresión aumenta en plantas *yaf9ayaf9b*. Los genes *XRCC4* y *Ku70*, característicos de la ruta de reparación por recombinación no homóloga (NHEJ) (Koch et al., 2004; Menges et al., 2005; Ascencio-Ibáñez et al., 2008) en el punto de control G1, también presentan una expresión ligeramente más elevada en plantas *yaf9a yaf9b* (Tabla 11).



Nombre	gen	Función	Fold change	p-value
<b>CDC6A</b>	At2g29680	Iniciación replicación	+2.69	0.00005455
<b>ORC4</b>	At2g01120	Iniciación replicación	+2.18	0.00017657
<b>AUR3</b>	At2g45490	Fase S	+1.77	0.00022055
<b>SMC6B</b>	At5g61460	Reparación HR/G2	+1.68	0.00067999
<b>SMC6A</b>	At5g07660	Reparación HR/G2	+1.43	0.00454551
<b>PARP1</b>	At4g02390	Reparación HR/G2	+1.39	0.02359813
<b>DDM1</b>	At5g66750	Metiltransferasa DNA	+1.38	0.00638472
<b>ASF1B</b>	At5g38110	Chaperona de H3	+1.22	0.02022002
<b>XRCC4</b>	At3g23100	Reparación NHEJ/G1	+1.17	0.03841528
<b>MSI1</b>	At5g58230	Chaperona de H3-H4	+1.17	0.03746795
<b>Ku70</b>	At1g16970	Reparación NHEJ/G1	+1.14	0.03807454
<b>SKP2A</b>	At1g21410	Mitosis	-1.59	0.00007970
<b>CCS52A2</b>	At4g11920	Promueve endociclo Degradación CYCB	-1.39	0.00101711

**Tabla 11. Genes implicados en la regulación del ciclo celular que se encuentran desregulados en mutantes *yaf9a yaf9b*.** Datos obtenidos mediante el análisis transcriptómico de los mutantes *yaf9ayaf9b* frente al parental silvestre, cultivados bajo condiciones de DC durante 20 días. En la tabla se muestra el nombre y número del gen, su función más característica y los valores de *foldchange* y *p-value*.

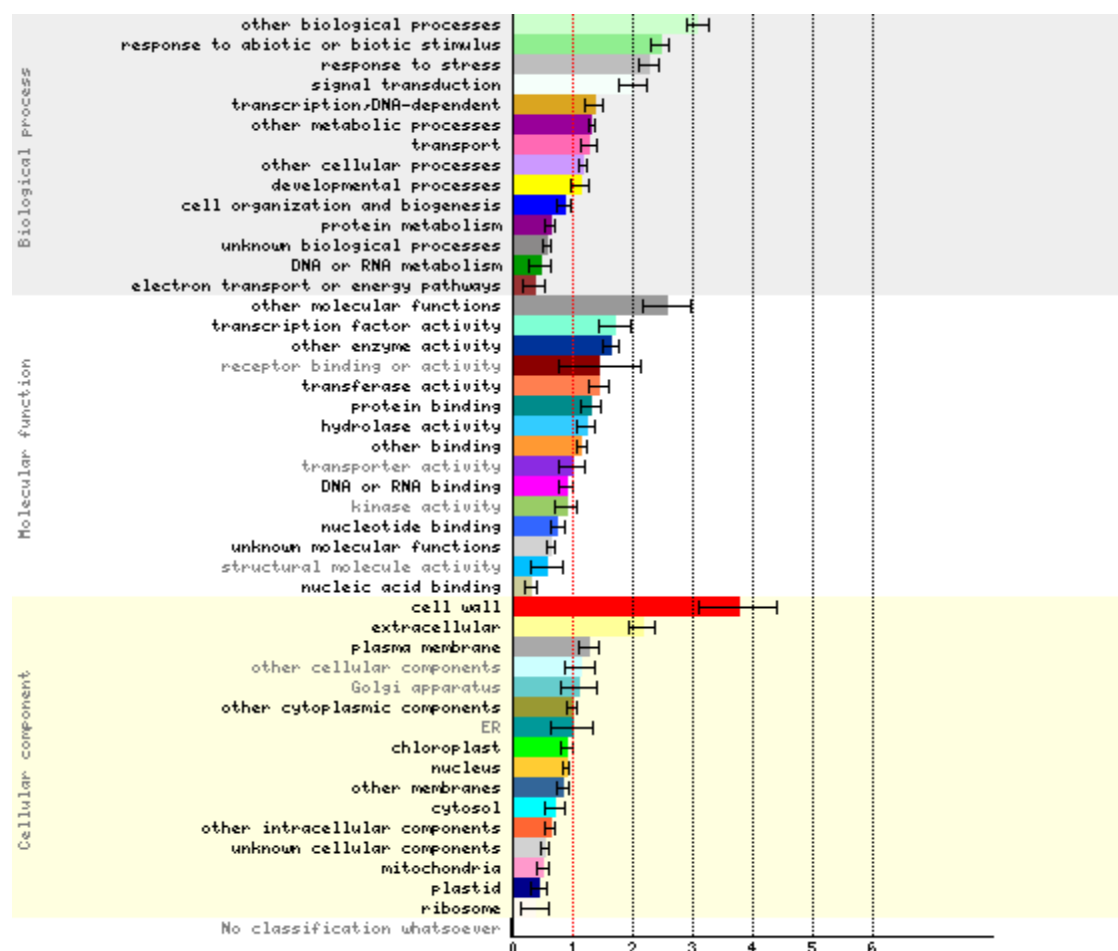
Según todos estos datos, la pérdida de función de los genes *YAF9A* y *YAF9B* podría provocar alteraciones en la regulación de las diferentes transiciones del ciclo celular, originando un mayor número de células epidérmicas que podrían sufrir una inhibición del endociclo. De esta manera, el balance entre la división celular y la endorreplicación fundamental en el desarrollo de las hojas (Gutiérrez, 2009), está descompensado en las plantas *yaf9a yaf9b*, que presentan hojas muy rizadas y de menor tamaño. Los valores obtenidos del análisis transcriptómico (tabla 11) apoyan la hipótesis de una posible implicación de los genes *YAF9A* y *YAF9B* en la regulación del ciclo celular, que es consistente con su participación en diferentes complejos remodeladores de la cromatina.

### 3.4. Análisis transcriptómico del doble mutante *yaf9a yaf9b*

En apartados anteriores, se ha demostrado que los genes *YAF9A* y *YAF9B* participan en la regulación de las transiciones del ciclo celular y en la regulación de la expresión de genes relacionados con el inicio de la floración, y presentan una cierta redundancia funcional en el control de estos procesos en *Arabidopsis*. Además, las plantas *yaf9a yaf9b* presentan otras alteraciones del fenotipo que afectan a diversos aspectos de su desarrollo, por lo que es posible que las proteínas *YAF9A* y *YAF9B* puedan formar parte de complejos remodeladores de cromatina que participen en la regulación de la expresión de genes implicados en estos procesos. Por esta razón, decidimos realizar un análisis transcriptómico del doble mutante *yaf9a yaf9b*, con el fin de obtener una visión global de los genes que se encuentran regulados, ya sea directa o indirectamente, por *YAF9A* y *YAF9B*. Para ello realizamos un análisis con microordenamientos de Affymetrix (*Arabidopsis* ATH1 Genome Array) que contienen más de 22.500 sondas representativas de unos 24.000 genes de *Arabidopsis*. Este experimento se realizó por triplicado, con RNA extraído de muestras tomadas a última hora del día (ZT8), de plántulas *yaf9a yaf9b* cultivadas durante 20 días en condiciones de fotoperiodos no inductivos (DC), y los datos se compararon con el perfil de expresión determinado en el correspondiente parental silvestre.

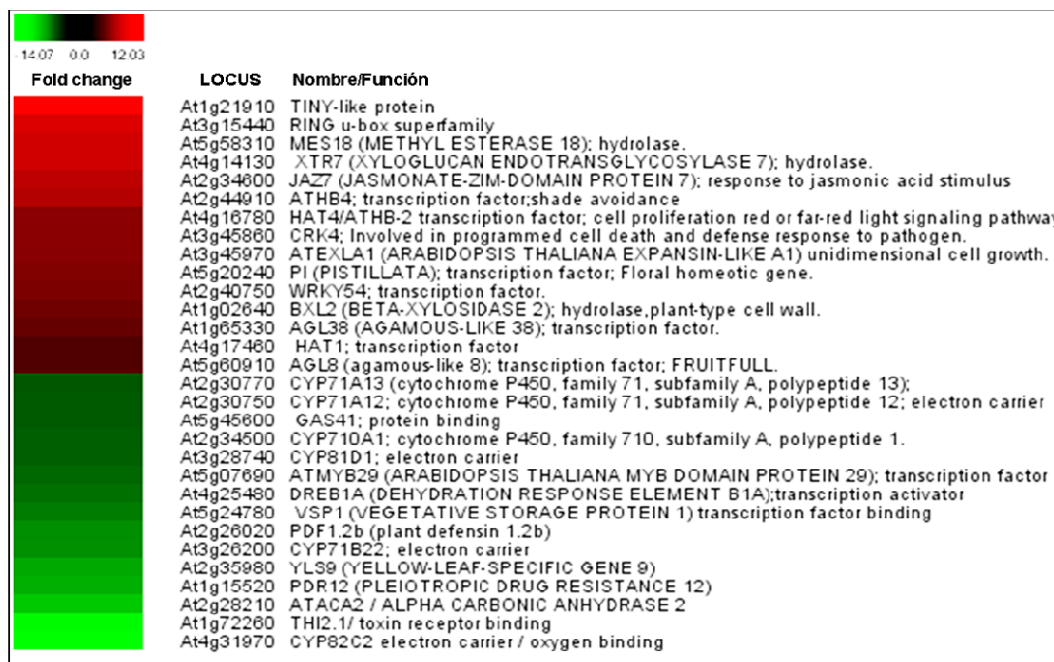
Para discriminar los genes cuyos niveles de expresión se veían modificados significativamente, se utilizaron valores de "*p-value*"  $\leq 0.05$ , que establece un 95% de confianza para los cambios detectados entre las muestras de *yaf9a yaf9b* y de Col. Inicialmente se establecieron umbrales de "*fold change*"  $\geq 2$ , para los genes sobreexpresados y  $\leq -2$ , para los genes reprimidos. Este análisis desveló un total de 274 genes, cuya expresión se veía aumentada en plantas de *yaf9a yaf9b*, y 180 genes cuyos niveles de expresión se veían reprimidos en comparación con los niveles detectados en el parental silvestre (Anexo 1). En la figura 65 representamos el análisis normalizado de todos los genes que se encuentran desregulados en las plántulas *yaf9a yaf9b* mediante la aplicación GO (Gene Ontology), clasificados en categorías que engloban diferentes procesos biológicos. Aquellas categorías que muestran valores superiores a 1 (Fig. 65) se encuentran sobrerrepresentadas en el conjunto de genes desregulados en las plantas *yaf9a yaf9b*. El diagrama muestra un enriquecimiento de las categorías relacionadas con procesos biológicos tales como la respuesta a factores bióticos y abióticos, la respuesta a estrés y la traducción de señales. A nivel molecular, la categoría donde se concentra el mayor número de genes desregulados corresponde con la actividad de factores transcripcionales. Finalmente, se observa un aumento de

genes desregulados en las categorías de componentes extracelulares y de genes relacionados con la pared celular.



**Fig. 65.** Estadística de la función desempeñada por los genes que tienen desregulada su expresión en plántulas *yaf9a yaf9b*. Los valores establecidos en el análisis son:  $p\text{-value} \leq 0.05$ ; " $fold\ change$ "  $\geq 2$  y  $\leq -2$ . Usamos el programa Classification SuperViewer Tool w/ Bootstrap para la realización de este análisis. [http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools\\_classification\\_superviewer.cgi](http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi). (Provar y Zhu, 2003).

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de microordenamientos, se seleccionaron los 15 genes que presentaban mayores diferencias en sus niveles de expresión, tanto activados como reprimidos, y se representaron en el diagrama recogido en la figura 66, mediante el programa Multiexperiment Viewer (MeV v4.8.1) <http://www.tm4.org/mev/> (Saeed et al., 2006).



**Fig. 66. Genes identificados en el análisis transcriptómico cuya expresión está desregulada en el mutante *yaf9a yaf9b* ( $p\text{-value} < 0.05$ ).** Se muestran los 15 genes más sobreexpresados y reprimidos, respectivamente. De izquierda a derecha se indica el “*fold change*” o valor de la expresión, el locus y el nombre de cada gen, junto con su actividad y función.

Como se observa en la figura 66, entre los genes que presentan mayores niveles de expresión en el doble mutante *yaf9ayaf9b*, destaca la existencia de un gran porcentaje de factores de transcripción de diferentes familias. Así, el gen que presenta los mayores niveles de sobreacumulación codifica la proteína DREB26, un factor de transcripción tipo AP2, implicado en la regulación positiva de la transcripción y en la respuesta al ácido salicílico (Krishnaswamy et al., 2011). Otros factores de transcripción que presentan elevados niveles de expresión en las plantas *yaf9a yaf9b* son los genes *At2g44910*; *ATHB-4* (*ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER PROTEIN 4*) implicado en la respuesta del síndrome de huida de la sombra y en el desarrollo de las hojas y cotiledones (Bou-Torrent et al., 2012); *At4g16780*, *ATHB-2* (*ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2*) implicado en la ruta de señalización de la luz roja y roja lejana (Kunihiro et al., 2011), *At2g40750*, *WRKY54*, que participa en la respuesta de defensa de la planta, a bacterias y hongos (Besseau y Palva, 2012) y *At4g17460*, *HAT1* que codifica una proteína de clase II HD-ZIP necesaria para la correcta formación del gineceo en las flores (Zúñiga-Mayo et al., 2012). Además, se encuentran entre los genes con mayor expresión, algunos genes de identidad de meristemo floral como, *At5g20240*, *PI* (*PISTILLATA*) (Wuest et al., 2012), *At5g60910*, *FUL/AGL8* (*FRUITFULL/ AGAMOUS-LIKE 8*) (Yamaguchi et al., 2009; Torti y Fornara,

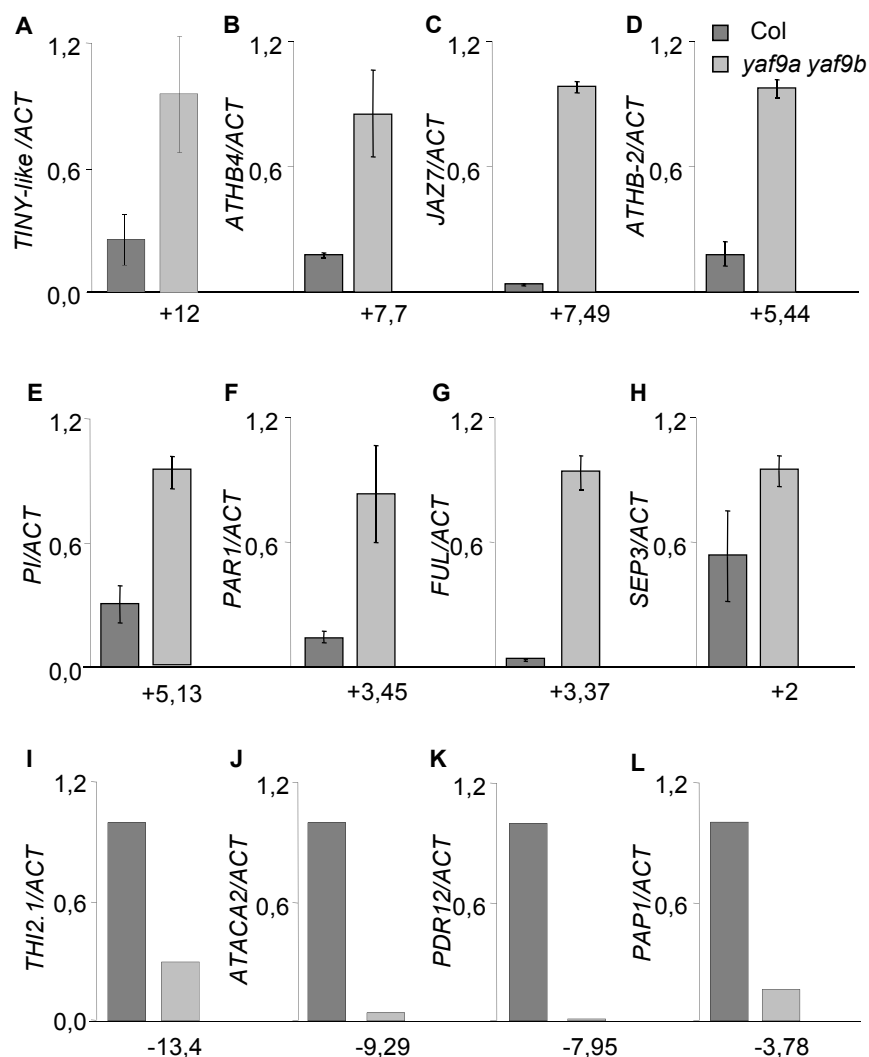
2012), *SEP3/AGL9* (Yamaguchi et al., 2009; Lee et al., 2012c) y At1g65330, *AGL37* (*AGAMOUS-LIKE 37*), un factor de transcripción implicado en el desarrollo del embrión (Villar et al., 2009; Schmidt et al., 2013).

También se observa una elevada expresión del gen At3g45860, que codifica *CRK4* (*CYSTEINE-RICH RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 4*), una proteína relacionada con la respuesta a patógenos y muerte celular programada (Wrzaczek et al., 2010), así como de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de la pared celular, que podrían mediar en la regulación del crecimiento celular (Fig. 65-66).

Entre aquellos genes que presentan menores niveles de expresión según el análisis transcriptómico de plantas *yaf9a yaf9b*, se observan diferentes genes de respuesta a estrés biótico y abiótico, como At4g31970, que codifica la proteína *CYP82C2* e interviene en la respuesta celular a hipoxia (Liu et al., 2010), At1g72260, *THI2.1* (*THIONIN 2.1*), cuya expresión está inducida por ácido jasmónico y etileno, así como en respuesta a patógenos, siendo su expresión independiente del ácido salicílico (Ochoa-Zarzosa et al., 2007); genes cuya expresión está inducida por etileno y están implicados en procesos de SAR, como At1g15520, *PDR12* (*PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12*) (Kang et al., 2011), y At2g35980, *YLS9* (*YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9*), que participa en la senescencia de la hoja y en la respuesta hipersensible de la planta (Lee et al., 2007). Los genes At3g28740, *CYP81D1* y At2g30770, *CYP71A13* (*cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 13*), con actividad oxidoreductasa, implicados en la respuesta de defensa (Bak et al., 2011; Matthes et al., 2011). Por último, también se encuentran expresados a niveles más bajos los factores de transcripción At5g24780, *VSP1* (*VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1*), que responde a estímulos de ácido jasmónico, At4g25480, *DREB1A* (*DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A*), implicado en la aclimatación al frío y en la respuesta a la salinidad hiperosmótica; y At5g07690, *ATMYB29* (*ARABIDOPSIS THALIANA MYB DOMAIN PROTEIN 29*) que también participa en procesos de la defensa de la planta.

Para validar los datos del análisis transcriptómico, realizamos ensayos de qPCR a partir de mRNAs extraído de plantas *yaf9a yaf9b* cultivadas en las mismas condiciones que las empleadas para los análisis transcriptómicos, y utilizamos cebadores específicos que nos permitieron comprobar la expresión de estos genes (Tabla 9). Así, corroboramos que ocho de los genes que aparecen con mayores niveles de expresión en los análisis de microordenamientos, como *TINY-like*, *ATHB4*, *JAZ7*, *ATHB-2*, *PI*, *PAR1* (*PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1*), *FUL*, *SEP3*, también presentan

elevados niveles de expresión en *yaf9a yaf9b* en nuestros experimentos de qPCR (Fig. 67). De igual manera comprobamos que los genes *THI2.1*, *ATACA2*, *PDR12* y *PAP1* (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1*) que aparecen reprimidos en los análisis transcriptómicos, también presentan bajos niveles de expresión en *yaf9a yaf9b* frente al ecotipo silvestre, mediante experimentos de qPCR (Fig. 67).



**Fig. 67. Análisis de la expresión de genes que aparece desregulados para *yaf9a yaf9b*.** Análisis mediante qPCR realizado con mRNA extraído de plántulas de Col y *yaf9a yaf9b* cultivadas durante 20 días, en condiciones de DC y recogidas al final del periodo de iluminación (ZT8). El punto ZT0 corresponde al inicio del periodo de iluminación. Debajo de cada gráfica se indica el valor de “fold change” que presenta cada gen en los análisis de microordenamientos, con un “*p-value*” < 0,0003. Expresión de los genes up-regulados, (A) *TINY-Like*, (B) *ATHB4*, (C) *JAZ7*, (D) *ATHB-2*, (E) *PI*, (F) *PAR1*, (G) *FUL/AGL8*, y (H) *SEP3*. Expresión de los genes down-regulados (I) *THI2.1*, (J) *ATACA2*, (K) *PDR12* y (L) *PAP1*. Como control de este experimento, se utilizó la expresión del gen  $\beta$ -ACT1 y la expresión de los genes problema se relativizó frente a la expresión de dicho gen.

Por tanto, los datos obtenidos a partir de los análisis transcriptómicos mediante microordenamientos, son comparables con los datos obtenidos, mediante experimentos de qPCR, y confirman la desregulación de estos genes en el doble mutante *yaf9a yaf9b*.

A continuación, profundizamos en el análisis de diferentes genes cuya expresión se encuentra desregula y que intervienen en procesos del desarrollo que están alterados en *yaf9ayaf9b* como el inicio de la floración. Sin embargo, estos genes no cumplen con los criterios de clasificación adoptados inicialmente en el diagrama mostrado en la figura 66. En este caso, tomamos un “*p-value*”  $\leq 0,05$  y valores de cambio o de “*fold change*”  $\geq 1.5$  y  $\leq -1.5$ .

Entre los genes implicados en la regulación de la transición floral, cuyos niveles de expresión se encuentran desregulados en plantas *yaf9a yaf9b*, se observa un descenso la expresión del represor *FLC* que podría contribuir al fenotipo de floración temprana mostrado por estas plantas. Por su parte, se observa un aumento de la expresión de *CO*, responsable de la activación de *FT* (Tiwari et al., 2010), así como del propio *FT*, *HAT1* y de los genes de identidad de meristemo floral, *FUL/AGL8* y *SEP3/AGL9* (Huang y Wu, 2007; Turck et al., 2008), responsables últimos del fenotipo de floración temprana desarrollado por las plantas *yaf9ayaf9b* (Anexo 1). Estos datos, sumados a los obtenidos en los análisis de expresión temporal (Fig. 62) son consistentes con la participación de los genes *YAF9A* y *YAF9B* en la regulación positiva del represor floral *FLC* y *FKF1*, cuya expresión está coordinada con la expresión del integrador floral *FT* y de genes de identidad de meristemo como *FUL* y *SEP3*, controlando el inicio de la floración.

De igual manera, se observa una desregulación de genes que codifican para otras subunidades del complejo SWR1, como *ACT1* y *SWC2* ((Wu et al., 2009; March-Díaz et al., 2007) y de la expresión de *HTA8*, uno de los tres genes que codifican para H2A.Z (March-Díaz et al., 2007; Coleman-Derr y Zilberman, 2012) (Anexo 1).

Como hemos podido comprobar anteriormente (Fig. 65 y 66), algunos de los genes clasificados por sus grandes diferencias de expresión, están implicados en mecanismos de respuesta de la planta frente a estrés biótico (Fig. 66; Anexo 1). Distintos datos experimentales sugieren un papel para el SWR1-C en el mantenimiento de la represión de la respuesta SAR, ya que los mutantes *pie1*, *swc6*, y *hta9 hta11* presentan un aumento de la expresión de genes implicados en dicha respuesta, mediada por ácido salicílico, sin exposición de las plantas a ningún agente biótico

(March-Díaz et al., 2008). Con el fin de determinar si los genes *YAF9A* y *YAF9B* participan en la respuesta de defensa SAR, comparamos algunos de los genes que participan en dicha respuesta que se encuentran regulados por SWR1-C, con los datos aportados por los análisis transcriptómicos de *yaf9a yaf9b* (Tabla 12). Según estos datos, en plantas mutantes *yaf9a yaf9b* se observan una serie de genes relacionados con la respuesta a patógenos cuya expresión se encuentra desregulada, sin que estas plantas hayan sido expuestas a tales patógenos.

Nombre	Gen	Función	Fold change	p.value
<b><i>ACD6</i></b>	At4g14400	Dependiente de NPR1	+4.18	0.00022049
<b><i>WRKY18</i></b>	At4g31800	Dependiente de NPR1	+3.33	0.00208233
<b><i>ATCNGC11/3</i></b>	At2g46440	Dependiente de NPR1	+2.10	0.00509431
<b><i>NIMIN1</i></b>	At1g02450	Dependiente de NPR1	+1.85	0.00005125
<b><i>PAD4</i></b>	At3g52430	Producción de SA	+1.85	0.00122290
<b><i>WRKY38</i></b>	At5g22570	Dependiente de NPR1	+1.49	0.01391000
<b><i>PR5</i></b>	At1g75040	Defensa a patógenos	+1.41	0.07132491

**Tabla 12. Genes relacionados con la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) que se encuentran desregulados en mutantes *yaf9a yaf9b*.** En la tabla se muestra el nombre del gen, su función más característica y los valores de cambio (*fold change*) y *p-value* obtenidos mediante análisis transcriptómico por microordenamientos.

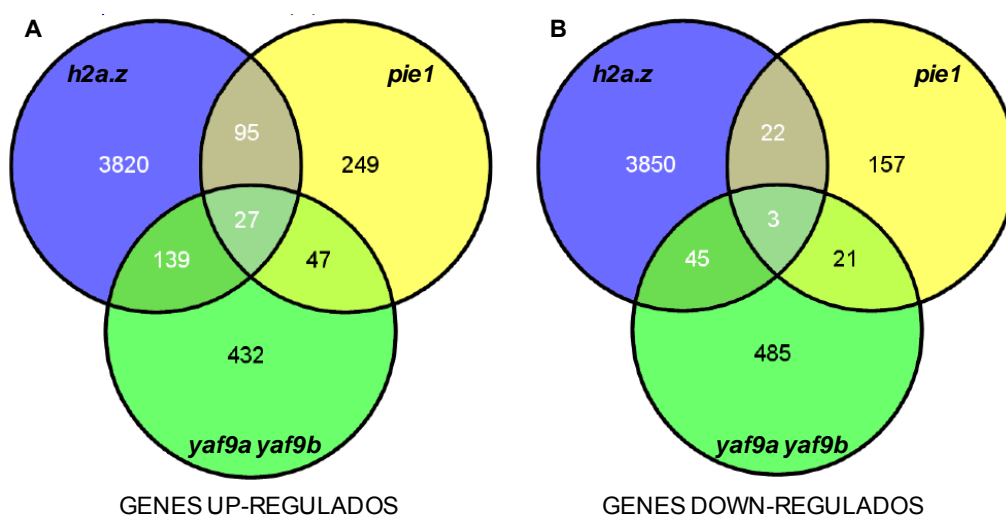
Observamos que genes dependientes de la expresión de *NPR1* (*NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED 1*) presentan un mayor nivel expresión en *yaf9a yaf9b*, si lo comparamos con el parental silvestre. *NPR1* codifica un factor de transcripción esencial en la regulación de los componentes de SAR que funcionan por debajo de la respuesta de SA (March-Díaz et al., 2008; Dong, 2004). Entre los genes sobreacumulados en plantas *yaf9a yaf9b*, dependientes de *NPR1*, se encuentran *ACCELERATED CELL DEATH 6 (ACD6)* (Yoshioka et al., 2006), *WRKY18* (Wang et al., 2006), *ATCNGC11/3*, *NIM1-INTERACTING 1 (NIMIN1)* (Weigel et al., 2005), *WRKY38* (Wang et al., 2006), *PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4)* y *PATHOGENESIS-RELATED 5 (PR5)* (March-Díaz et al., 2008).

Por tanto, la pérdida de función de los genes *YAF9A* y *YAF9B* impide que la planta pueda mantener la respuesta SAR reprimida y se activan los mecanismos de defensa sin necesidad de una exposición a patógenos. Es posible que *YAF9A* y *YAF9B* junto con *SWC4*, participen formando parte del SWR1-C, en procesos relacionados con la defensa de las plantas, a través de la respuesta SAR.



Puesto que se han realizado análisis transcriptómicos para los mutantes *pie1* (March-Díaz et al., 2008) y *h2a.z* (Coleman-Derr y Zilberman, 2012), relacionados con el SWR1-C, nos preguntamos si los genes desregulados en cada uno de ellos solaparían con los encontrados en las plantas *yaf9a yaf9b*. Para ello, realizamos una comparativa de los genes desregulados en los diferentes análisis transcriptómicos, publicados hasta el momento mediante el programa informático:

<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>, y fue representada mediante diagramas de Venn (Oliveros, 2007), como se muestra en la figura 71.



**Fig.68. Comparativa de los diferentes análisis transcriptómicos de mutantes relacionados con el SWR1-C de Arabidopsis.** Comparativa de los ensayos de microordenamientos llevados a cabo con plantas *yaf9a yaf9b*, cultivadas en DC durante 20 días, plantas *pie1*, cultivadas en DC durante 14 días (March-Díaz, et al., 2008) y plantas *h2a.z*, cultivadas durante 28 días, en DL (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). (A) Representación mediante diagrama de Venn de los genes sobreexpresados (up-regulados) y (B) reprimidos (down-regulados) en plantas *yaf9ayaf9b*, *pie1*, *hta9hta11* y *h2a.z*, comparado con plantas del ecotipo silvestre en cada caso.

Según los datos obtenidos de los análisis transcriptómicos realizados para los mutantes *yaf9a yaf9b*, *pie1*, y *h2a.z*, el 13% de los genes que se encuentran sobreexpresados en el mutante *yaf9a yaf9b* respecto al ecotipo silvestre, también lo están en los mutantes *h2a.z*, según los datos publicados por Coleman-Derr y Zilberman (2012). De estos genes, solo un 4,2% se expresan también a niveles más elevados en el mutante *pie1*, respecto al ecotipo silvestre (Fig. 68A). En el caso de los genes que se encuentran reprimidos en los mutantes *yaf9a yaf9b*, tan solo un 7,4% de estos genes

coinciden con menores niveles de expresión en las plantas *h2a.z* y únicamente tres genes se muestran down-regulados en los distintos mutantes (Fig. 68B).

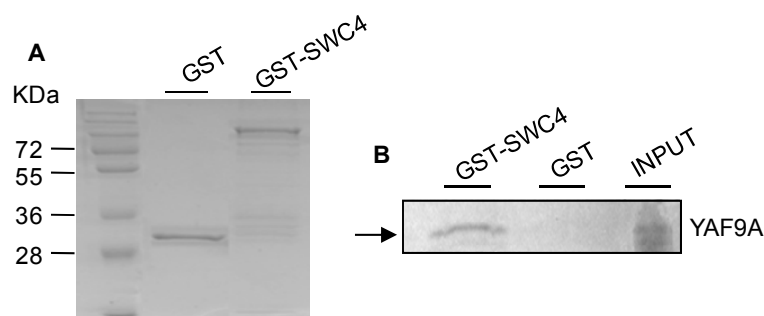
Estos datos sugieren que el nivel de solapamiento entre los genes regulados por *YAF9A* y *YAF9B* y aquellos que se encuentran regulados por otras subunidades del complejo SWR1 o por la presencia de H2A.Z, no es muy alto, lo que podría indicar funciones adicionales para las subunidades *YAF9A* y *YAF9B* formando parte de otros complejos implicados en la regulación de la expresión génica en *Arabidopsis*.

### **3.5. Análisis de la posible interacción física entre componentes del SWR1-C de *Arabidopsis***

Como describimos en apartados anteriores, en el SWR1-C de levaduras se ha descrito la interacción física de Swc4 y Yaf9, dos subunidades compartidas por el NuA4-C (Kobor et al., 2004; Wu et al., 2005). Por ello, nos propusimos profundizar en la posible interacción de las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A presentes en *Arabidopsis*. De la misma manera, analizamos la posible interacción física de estas subunidades con la proteína SWC6, también objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

#### **3.5.1. Análisis de la interacción física de AtSWC4 y AtYAF9A**

De manera similar a los ensayos realizados para demostrar la interacción existente entre las subunidades SWC6 y ARP6/ESD1 (Fig.17), realizamos un ensayo de pull down *in vitro*, con las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A. Para este experimento utilizamos una fusión de la proteína GST con la proteína SWC4 y una proteína YAF9A sintetizada a partir de una traducción *in vitro* con metionina marcada radiactivamente ( $S^{35}$ ) (Fig. 69). Tras la incubación de GST-SWC4 o GST, con la proteína YAF9A marcada radiactivamente, pudimos comprobar que la proteína GST-SWC4 era capaz de interaccionar con la proteína YAF9A, pero no la proteína GST (Fig. 69). Estos datos confirman la interacción física entre las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A en *Arabidopsis*, de forma similar a como ocurre en el SWR1-C de levaduras.

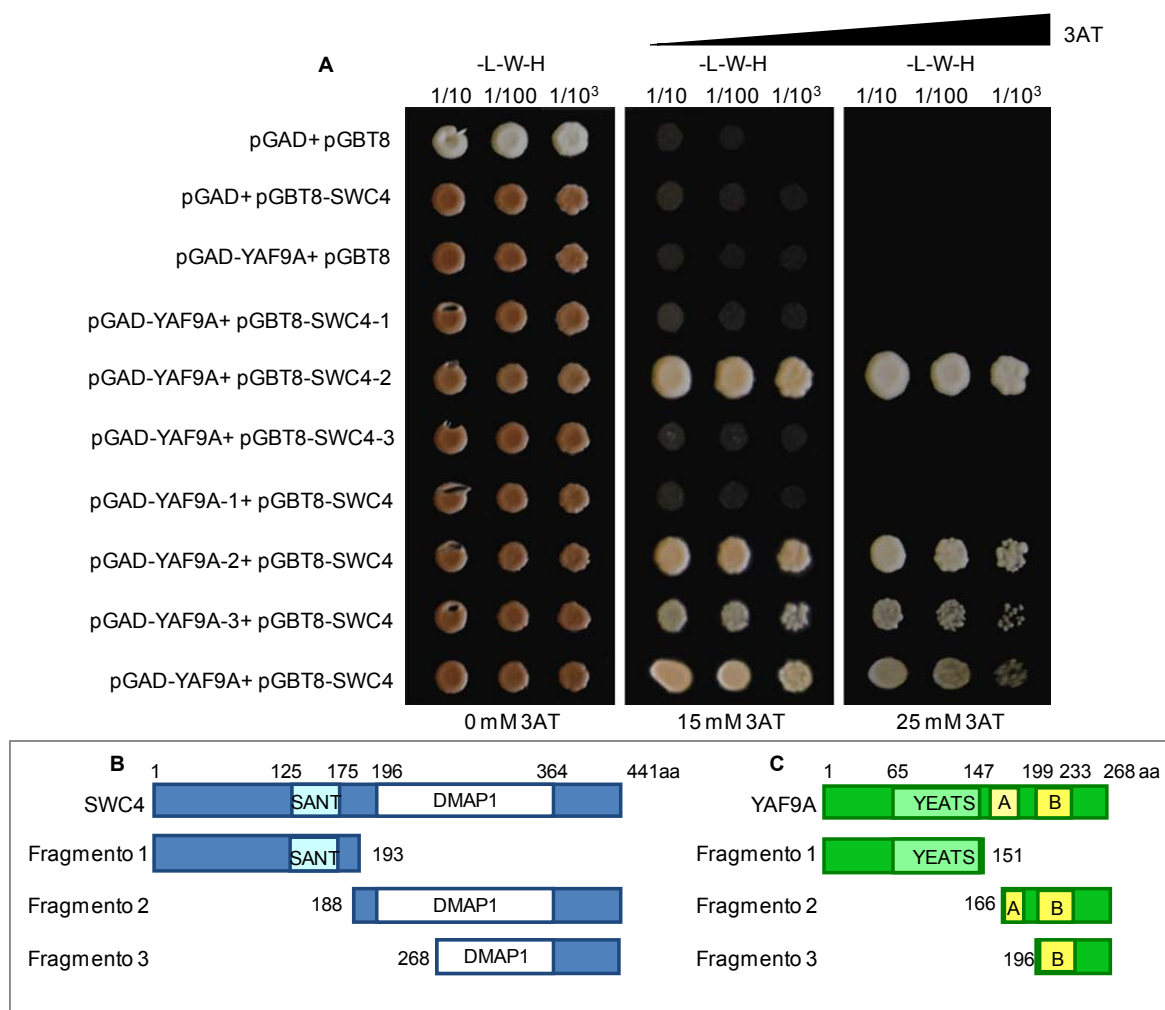


**Fig.69. Ensayo de pull-down con las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A.** (A) Gel de poliacrilamida mostrando las proteínas purificadas GST y GST-SWC4 producidas en *E.coli*. (B) Tanto GST como GST-SWC4 se incubaron con la proteína YAF9A marcada radioactivamente con [ $^{35}$ S]Met. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron electroforéticamente y se transfirieron a una membrana Inmobilon (Millipore). La proteína YAF9A se visualizó después de la exposición de la membrana a un film autorradiográfico.

Para confirmar la interacción observada *in vitro* entre las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A de Arabidopsis, llevamos a cabo una aproximación de doble híbrido en levaduras. Para ello, la secuencia completa de la proteína AtSWC4 se expresó fusionada al dominio GBD de GAL4 y la secuencia de la proteína YAF9A se fusionó al dominio GAD de GAL4. Como se muestra en la Fig. 70, las levaduras que coexpresan las proteínas de fusión GAD-YAF9A y GBD-SWC4 fueron capaces de crecer en medio selectivo sin histidina y en presencia de 3-AT, debido a la activación del gen reportador *GAL1::HIS3*, lo que indica que las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A de Arabidopsis son capaces de interactuar *in vivo* en levaduras.

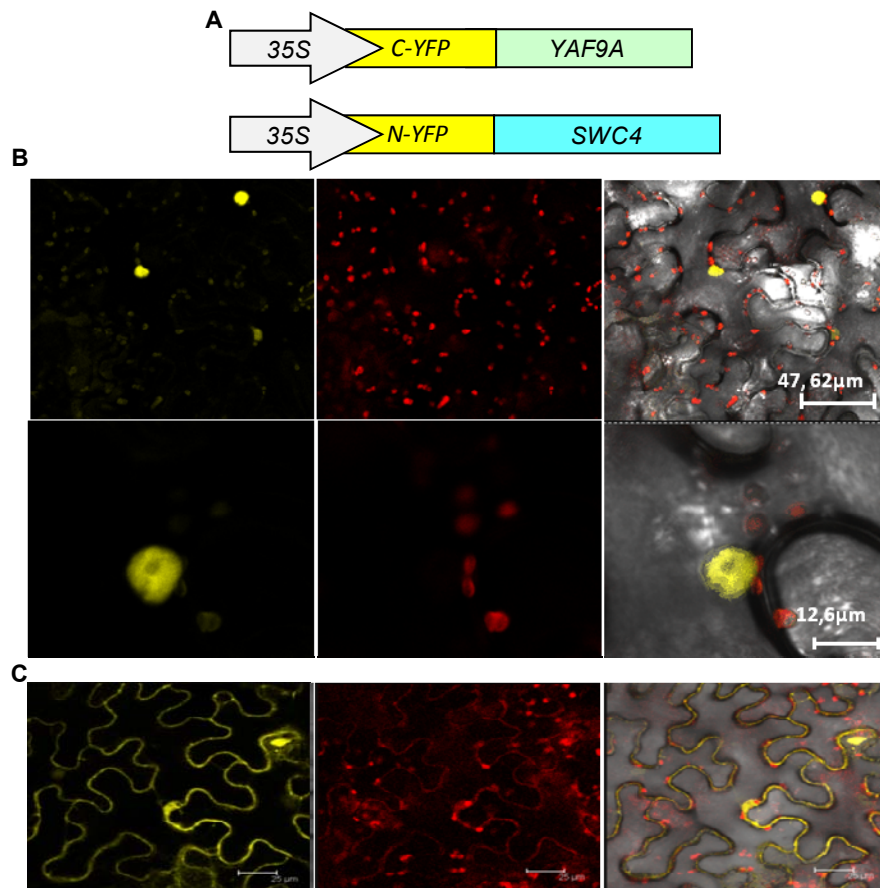
Con el fin de determinar los dominios implicados en la interacción entre ambas proteínas, generamos diferentes fragmentos truncados de las proteínas YAF9A y de SWC4. Los distintos fragmentos de SWC4 (Fig. 70B), se fusionaron al dominio GBD de GAL4, mientras que los fragmentos de YAF9A (Fig. 70C) se fusionaron al dominio GAD de GAL4. Estas proteínas de fusión se utilizaron para posteriores experimentos de doble híbrido. Según estos ensayos, pudimos determinar que el fragmento 2 de SWC4, que contiene el dominio DMAP1 completo, del extremo C-terminal de la proteína, era capaz de interactuar con la proteína YAF9A completa (Fig. 70A). Sin embargo, el fragmento 3 de SWC4, que contiene solo una porción del dominio DMAP1, no era capaz de interactuar con YAF9A (Fig. 70A), indicando que dicho dominio es esencial para la interacción de SWC4 con YAF9A. De la misma manera, determinamos que tanto el fragmento 2 como el fragmento 3 de YAF9A, ambos conteniendo la caja B en el extremo C-terminal de dicha proteína, eran capaces de interactuar con la proteína SWC4

completa. Por tanto, se puede concluir que SWC4 y YAF9A interactúan físicamente entre sí a través de los dominios presentes en sus extremos C-terminales.



**Fig. 70. AtSWC4 y AtYAF9A interactúan físicamente en levaduras.** (A) Ensayo de doble híbrido utilizando las proteínas completas AtSWC4 y AtYAF9A o fragmentos de las mismas, fusionados a los dominios de unión de DNA y de activación de GAL4, respectivamente. Levaduras Y190 se transformaron con vectores conteniendo estas construcciones o con los vectores vacíos (pGBT8 y pGAD) y se cultivaron distintas diluciones (1/10, 1/100 y 1/10<sup>3</sup>) en medio selectivo (SC -L, -W, -H), con distintas concentraciones de 3-AT (0, 15 y 25 mM). (B) Esquema de la proteína AtSWC4 completa, con 441 aminoácidos (aa), y de los fragmentos usados para los ensayos de doble híbrido con la proteína AtYAF9A. El fragmento 1 de AtSWC4 contiene el dominio SANT, el fragmento 2 contiene al dominio DMAP1 completo y el fragmento 3 contiene los últimos 96 aminoácidos del extremo C-terminal de SWC4, que contienen tan solo 8 de los 168 aa del dominio DMAP1. (C) Esquema de la proteína AtYAF9A completa, con 268 aminoácidos y de los fragmentos de AtYAF9A usados para ensayos de doble híbrido con la proteína AtSWC4. El fragmento 1 de YAF9A contiene el dominio YEATS, el fragmento 2, contiene las cajas A y B, y el fragmento 3, incluye solo la caja B, del extremo C-terminal de AtYAF9A.

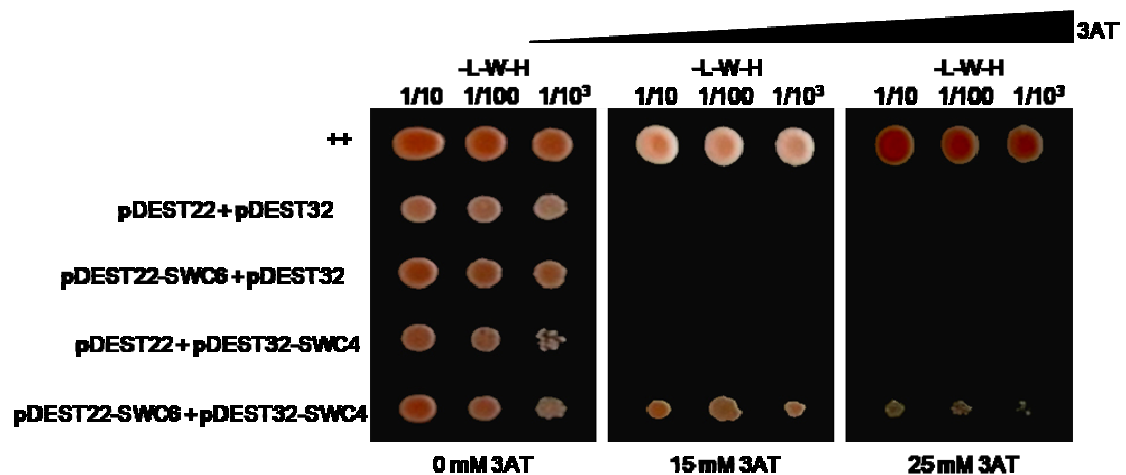
Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* y en los experimentos de doble híbrido en levaduras, en los que se demuestra la interacción física de AtSWC4 y AtYAF9A, han sido corroborados por el estudio *in vivo*, mediante ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC), en plantas de *N. benthamiana* (Fig.71B). Para ello, generamos distintas construcciones donde el extremo N-terminal de la YFP (N-YFP) se fusionó con la proteína AtSWC4 y el fragmento C-terminal de la YFP (C-YFP) se fusionó, con la proteína AtYAF9A. Estas construcciones se transformaron en *A. tumefaciens* y posteriormente, se agroinfiltraron en plantas de *Nicotiana* que expresarían dichas proteínas de forma transitoria, siguiendo los protocolos previamente descritos en Voinnet et al., 2003. Pasados 3-4 días después de la infiltración, se observaron las hojas transformadas, por su cara abaxial, mediante microscopía confocal y se determinó que las proteínas de fusión N-YFP-SWC4 y C-YFP-YAF9A, eran capaces de interactuar, y por lo tanto de reconstituir la proteína YFP, emitiendo fluorescencia en el núcleo de las células epidérmicas (Fig.71B). Estos datos nos revelan que las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A, ambas fusionadas con la porción correspondiente de YFP, por su extremo N-terminal, son capaces de interactuar también *in vivo*. Como control positivo de estos experimentos, se utilizaron las construcciones amino y carboxilo de las proteínas AKIN $\beta$  y AKIN10 (Sucrose non fermenting (Snf1)-related kinases) (Ferrando et al., 2001). Estas proteínas son capaces de interactuar tanto en el núcleo como en la membrana plasmática de las células (Fig. 71C). Como controles negativos, se combinaron las construcciones de AtSWC4 y AtYAF9A fusionadas a las distintas porciones de YFP, con los correspondientes vectores vacíos, y en ningún caso se observó emisión de fluorescencia.



**Fig. 71. AtSWC4 y AtYAF9A interactúan *in vivo* en *N. benthamiana*.** (A) Esquema de la construcción de SWC4 fusionada a N-YFP y de YAF9A fusionada a C-YFP, ambos por su extremo N-terminal, dirigidos por un promotor 35S. (B) Ensayo de BiFC donde se observa la fluorescencia originada por la formación de la YFP, que corrobora la interacción de SWC4 y YAF9A en el núcleo de las células epidérmicas. En el segundo panel se observa la autofluorescencia emitida por la clorofila de las hojas de *Nicotiana*. En el tercer panel se muestra la superposición de ambas imágenes con la imagen óptica de la misma sección de la hoja estudiada. (C) Control positivo utilizando las construcciones N-YFP-AKIN $\beta$  y C-YFP-AKIN10 (Ferrando et al., 2001). Imagen de microscopía confocal tomada con un microscopio modelo Leica SP2 de las células epidérmicas de la cara abaxial de las hojas agroinfiltradas de *Nicotiana*. Las imágenes fueron analizadas mediante el software Leica LCS Lite.

### 3.5.2. Interacción física de la proteína AtSWC6 con AtSWC4 y AtYAF9A de Arabidopsis

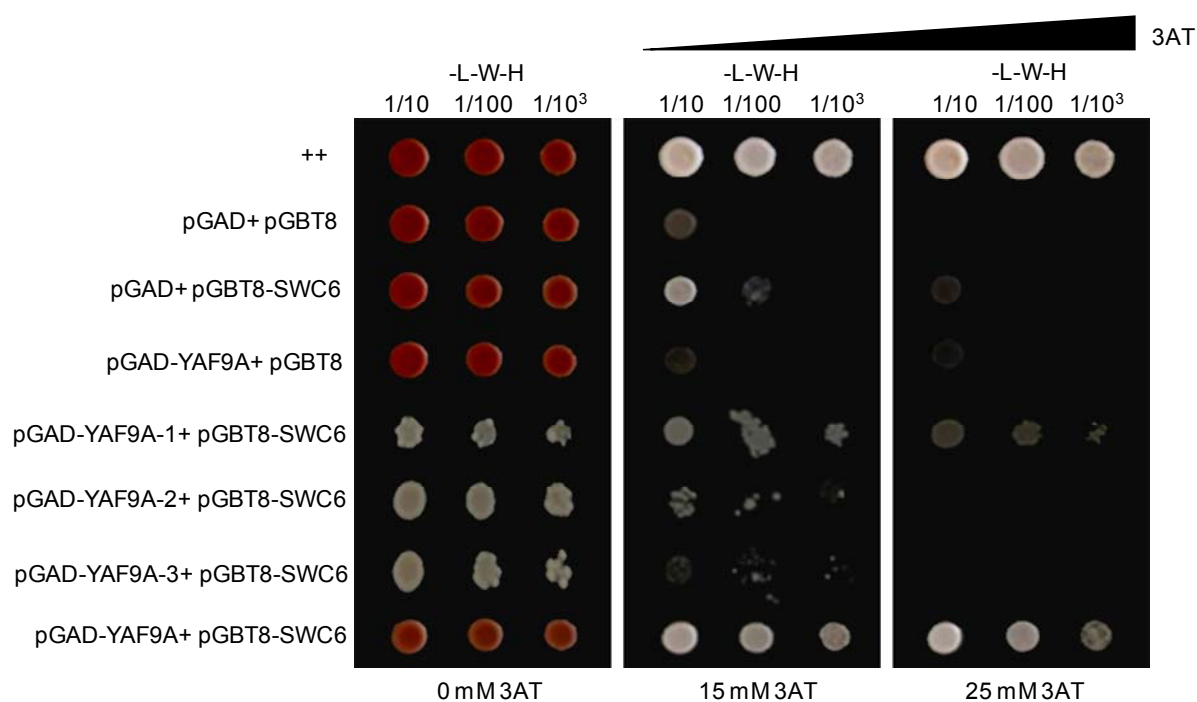
Después de comprobar la existencia de una interacción física entre las proteínas AtSWC4 y AtYAF9A (Fig. 69-71) y de haber observado que AtSWC6 también interacciona físicamente con AtARP6/ESD1 (Fig. 17-18), nos planteamos analizar la existencia de una posible interacción física de AtSWC6 con AtSWC4 y AtYAF9A. Para ello, utilizamos las construcciones de AtSWC6 fusionado al dominio de activación de GAL4 y de AtSWC4 unida al dominio GBD y realizamos aproximaciones de doble híbrido en levaduras. A partir de estos ensayo comprobamos que ambas proteínas interaccionan entre sí (Fig. 72).



**Fig. 72. AtSWC6 interacciona físicamente con AtSWC4 en levaduras.** Ensayo de doble híbrido utilizando las proteínas completas AtSWC6 y AtSWC4, fusionadas a los dominios de activación de GAL4 y de unión de DNA, respectivamente. Las levaduras Y190 se transformaron con estas construcciones o con los vectores vacíos (pDEST22 y pDEST32) y se crecieron diluciones crecientes de izquierda a derecha (1/10, 1/100 y 1/10<sup>3</sup>) en medio selectivo (SC -L, -W, -H), con distintas concentraciones de 3-AT (0, 15 y 25 mM).

Por otra parte, utilizando la construcción de AtYAF9A fusionada al dominio de activación de GAL4, pudimos demostrar, de la misma manera, que interaccionaba con la proteína AtSWC6 fusionada al dominio de unión al DNA de GAL4, en levaduras. Además, combinando AtSWC6 con los diferentes fragmentos de AtYAF9A, se comprobó que AtSWC6 interacciona específicamente, con el fragmento 1 de AtYAF9A (Fig. 73), que contiene el dominio YEATS completo (Fig. 70C). En definitiva, la proteína AtYAF9A interacciona con AtSWC6 a través de un dominio diferente al que interacciona con AtSWC4.

Además de las interacciones descritas, hemos realizado ensayos de doble híbrido en levaduras, para comprobar la interacción de AtYAF9A consigo misma, por si pudiera dimerizar, de la proteína AtYAF9A con AtYAF9B, de la proteína AtYAF9B con ella misma, y de AtYAF9B con AtSWC6 y con AtSWC4. En ninguno de estos ensayos hemos observado una interacción positiva, sugiriendo que, ni la proteína AtYAF9A ni AtYAF9B son capaces de dimerizar y que, a pesar de su homología a nivel de secuencia, AtYAF9A y AtYAF9B se comportan de forma diferencial en los ensayos de doble híbrido realizados en levaduras.



**Fig. 73. AtSWC6 interacciona físicamente con AtYAF9A, en levaduras.** Ensayo de doble híbrido utilizando las proteínas completas AtSWC6 y AtYAF9A o fragmentos de ésta última (Fig.73C), fusionados a los dominios de unión de DNA y de activación de GAL4, respectivamente. Las levaduras Y190 se transformaron con vectores conteniendo estas construcciones o con los vectores vacíos (pGBT8 y pGAD) y se crecieron distintas diluciones, 1/10, 1/100 y 1/10<sup>3</sup>, en medio selectivo (SC -L, -W, -H), con distintas concentraciones de 3-AT (0, 15 y 25 mM).

Los resultados obtenidos en relación con las interacciones físicas entre las proteínas ensayadas, indican que AtSWC4 y AtYAF9A, cuyos ortólogos en levaduras forman parte de los complejos SWR1 y NuA4 (Kobor et al., 2004; Wu et al., 2005), interaccionan físicamente entre sí. Además, ambas proteínas interaccionan igualmente con AtSWC6, cuyo ortólogo en levaduras se encuentra exclusivamente en el complejo SWR1 (Cai et al., 2005). A partir de los ensayos de doble híbrido realizados, se ha



demostrado que la proteína SWC6 interacciona con YAF9A a través del dominio YEATS. Estos datos sugieren que la proteína YAF9A interacciona de forma diferencial con otras subunidades del complejo SWR1-C, interacciona por su extremo N-terminal con la proteína SWC6 y por su extremo carboxilo-terminal con el dominio DMAP1 de la proteína AtSWC4.

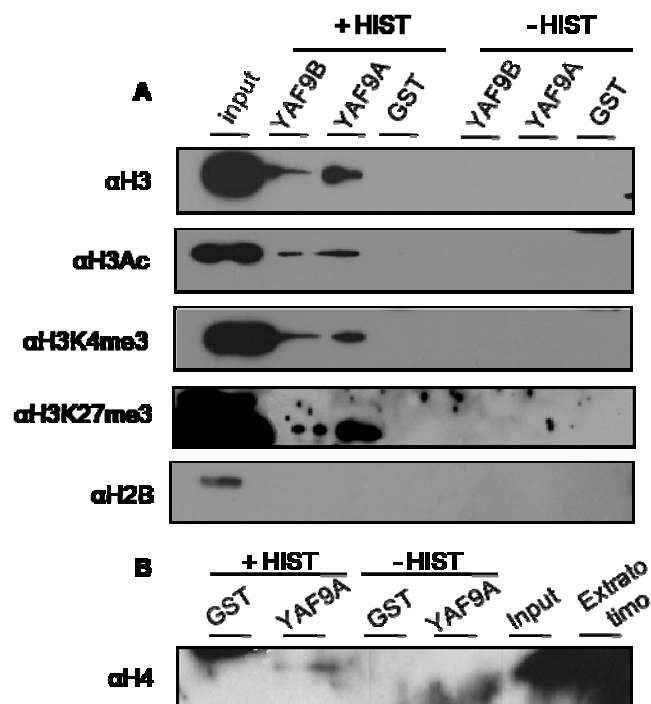
En el caso de Arabidopsis, parece que, al igual que en levaduras, AtSWC4 y AtYAF9A interaccionan entre sí y que las proteínas AtSWC6 y AtARP6/ESD1 también son capaces de unirse. Adicionalmente, nuestros resultados revelan por primera vez la interacción entre proteínas de los dos subdominios del complejo SWR1-C en Arabidopsis.

### **3.6. Ensayos de unión de las proteínas AtYAF9A y AtYAF9B a extractos de histonas de Arabidopsis**

Dada la similitud conformacional del dominio YEATS de la proteína Yaf9 con uno de los dominios de la proteína ASF1 de levaduras, implicado en la unión a las histonas H3 y H4, y la demostración de que la proteína Yaf9 de levaduras era capaz de unirse tanto a histona H3 como H4, *in vitro* (Wang et al., 2009b), decidimos profundizar en la posible interacción de las proteínas AtYAF9A y AtYAF9B con histonas de Arabidopsis, de forma similar a los ensayos llevados a cabo con SWC4 (Fig.46). Para ello, realizamos ensayos de unión, donde las proteínas completas AtYAF9A y AtYAF9B fusionadas a GST, se combinaron con extractos de histonas purificados de células MM2d de Arabidopsis en cultivo (Fujiyama et al., 2002). Las histonas que eran capaces de unirse a las proteínas AtYAF9A y AtYAF9B recombinantes, se visualizaron en experimentos de western blot, empleando anticuerpos específicos  $\alpha$ H3,  $\alpha$ H3Ac,  $\alpha$ H3K4me3,  $\alpha$ H3K27me3,  $\alpha$ H4 y  $\alpha$ H2B.

Como se observa en la figura 74, tanto AtYAF9A como AtYAF9B son capaces de unirse a las histonas H3 y a diferentes formas modificadas de la misma (H3Ac, H3K4me3, H3K27me3). Por su parte, AtYAF9A también se une a la histona H4 (Fig. 74B). Con el fin de descartar una unión inespecífica de AtYAF9A y AtYAF9B con estas histonas, realizamos experimentos de unión con extractos de histonas de Arabidopsis similares a los descritos anteriormente, empleando en este caso, un anticuerpo específico frente a la histona H2B. Finalmente, no se detectó interacción de AtYAF9A ni de AtYAF9B con la histona H2B, lo que nos permite concluir que la unión de las proteínas AtYAF9A y AtYAF9B a las histonas H3 y H4 es específica (Fig. 74). Como

control negativo de esta unión, se observó que la proteína GST no es capaz de interactuar con ninguna de las histonas ensayadas, presentes en los extractos purificados de Arabidopsis (Fig. 74). Por lo tanto, nuestras observaciones indican que tanto AtYAF9A como AtYAF9B son capaces de interactuar *in vitro* y de forma específica con las histonas H3, sus formas modificadas H3Ac, H3K4me3, H3K27me3, y que la proteína AtYAF9A se une *in vitro* a la histona H4 de Arabidopsis.



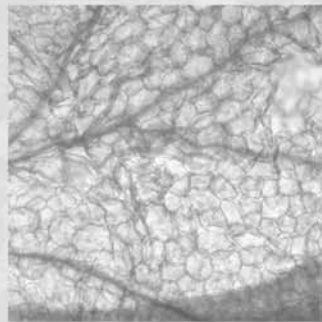
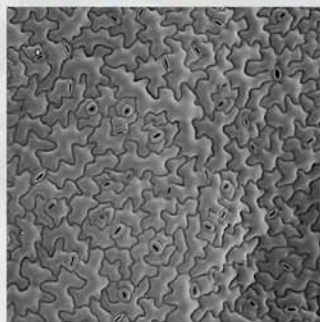
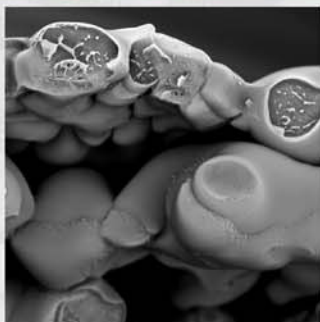
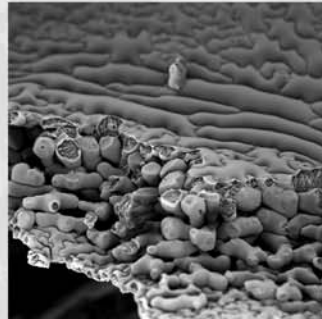
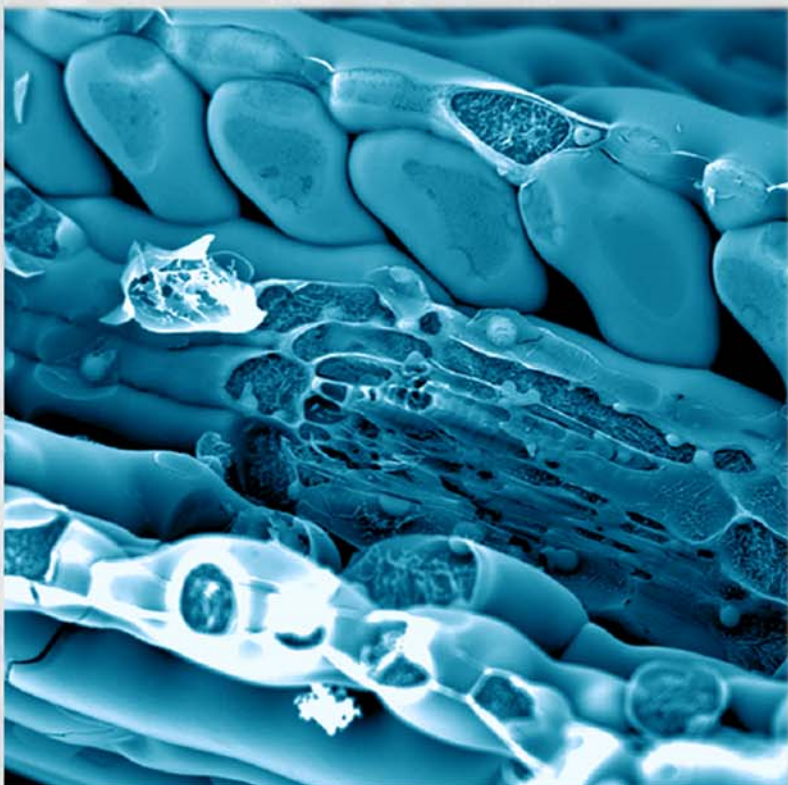
**Fig.74. Ensayos de unión de AtYAF9A y AtYAF9B a histonas de Arabidopsis.** (A) Ensayos de unión de las proteínas AtYAF9A y AtYAF9B fusionadas a GST o de GST, con las histonas H3, H3Ac, H3K4me3, H3K27me3 y H2B, procedentes de líneas celulares de Arabidopsis o sin extracto de histonas. (B) Ensayos de unión de la proteína AtYAF9A-GST o de GST con la histona H4. La unión se detectó mediante experimentos de western blot con los anticuerpos correspondientes. Como input se utilizó un 5% del extracto de histonas de Arabidopsis y/o 1% de extracto de histonas de timo de ratón.

En resumen, el estudio realizado con los genes homólogos a *YAF9* de Arabidopsis, nos permite concluir que tanto *YAF9A* como *YAF9B* participan de forma parcialmente redundante, en el control del tiempo de floración, afectando a la expresión de represores como *FLC*, al menos bajo condiciones de fotoperiodo no inductivos. Además, la caracterización de las alteraciones fenotípicas realizadas en los mutantes *yaf9a yaf9b* junto con los datos obtenidos del análisis transcriptómico de dichos mutantes, han permitido determinar que ambos genes participan en multitud de procesos esenciales para el desarrollo de la planta, tales como la progresión del ciclo

celular, la reparación de daños ocasionados en el DNA, en el desarrollo de la raíz, hojas y flores o en la respuesta de defensa de la planta a patógenos. Por último, la demostración de la interacción física de AtYAF9A con AtSWC4 y AtSWC6, sumada a los datos que demuestran la unión *in vitro*, de YAF9A y de YAF9B con las histonas H3 y H4, sugieren la participación de estas proteínas en complejos remodeladores, similares a los descritos en levaduras, que participen en la regulación de la expresión génica, mediante cambios en la dinámica y en la organización de la cromatina.



# DISCUSIÓN





Los procesos de remodelación de la cromatina desempeñan un papel central en el establecimiento de los patrones de expresión génica que dirigen el desarrollo de las plantas. Las modificaciones producidas en la organización de la cromatina proporcionan un mecanismo que asegura la estabilidad de estos patrones de expresión a lo largo de las divisiones mitóticas y son heredadas incluso cuando ha desaparecido el estímulo que los provocó (Reyes, 2006; Jarillo et al., 2009; Bonasio et al., 2010; Lauria y Rossi, 2011). Profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares por los que distintas modificaciones epigenéticas modulan los patrones de expresión génica, es fundamental para mejorar nuestra comprensión de los procesos de desarrollo y de diferenciación en organismos eucarióticos y en particular en las plantas.

Las plantas presentan la cualidad de acoplar su desarrollo en respuesta a un conjunto de factores endógenos y ambientales, que les proporciona una gran plasticidad para adaptarse al medio y a los cambios que se producen a su alrededor, y su supervivencia depende de la capacidad de respuesta que presentan a estos cambios (Kumar y Wigge, 2010). La estructura dinámica de la cromatina permite modular estos mecanismos de adaptación de la planta mediante la regulación de la expresión transcripcional de componentes de las rutas que controlan la transición floral y de los propios integradores florales (Farrona et al., 2008; Berr et al., 2011; Choi et al., 2011; Crevillén y Dean, 2011).

El aislamiento de mutantes con fenotipo de floración temprana ha puesto de manifiesto la existencia de una gran variedad de genes y de mecanismos moleculares implicados en la represión de la transición floral (Jarillo y Piñeiro, 2011). De hecho, el estudio del represor floral *FLC* ha permitido la identificación de los principales complejos remodeladores de cromatina descritos en *Arabidopsis*, convirtiéndolo, de esta manera, en un ejemplo excelente de la regulación epigenética de la transcripción en plantas (Deal y Henikoff, 2010; Crevillén y Dean, 2011). Además de *FLC*, la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* también está regulada por procesos de reorganización de la cromatina (Bouveret et al., 2006; Adrian et al., 2010; Lee y Lee, 2010), confirmando el papel esencial que desempeñan los mecanismos de regulación epigenética en la transición floral.

El interés que ha suscitado el estudio de estos mecanismos epigenéticos en la regulación de la transición floral, ha puesto de manifiesto el papel esencial que desempeña el intercambio de la histona canónica H2A por la variante histónica H2A.Z en la regulación de la expresión génica no sólo en plantas, sino en distintos organismos

eucariotas (Draker y Cheung, 2009; Svolitelis et al., 2009; Marques et al., 2010). Este intercambio histónico origina determinadas alteraciones en la compactación de la cromatina que se han relacionado con diferentes procesos, algunos incluso antagónicos, como el silenciamiento génico por la formación de heterocromatina o la activación de la expresión génica, la memoria transcripcional, la progresión del ciclo celular o la respuesta génica termosensible (Dhillon et al., 2006; Brickner et al., 2007; Zlatanova y Thakar, 2008; Kumar y Wigge, 2010; Light et al., 2010; Coleman-Derr y Zilberman, 2012). En *Arabidopsis* aún no se ha determinado el papel exacto que juega la variante histónica H2A.Z en la regulación de la transcripción génica, ya que se ha relacionado tanto con la represión transcripcional de ciertos genes sensibles a determinados estímulos, como con la activación de la expresión de determinados genes como *FLC* (Deal et al., 2007; March-Díaz et al., 2008; Kumar y Wigge, 2010; Smith et al., 2010).

La secuencia de la variante H2A.Z se encuentra muy conservada en los distintos organismos, y es una proteína esencial para la viabilidad de especies como *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* o *Mus musculus* (Clarkson et al., 1999; Faast et al., 2001). En el caso de *Arabidopsis*, mutantes para los genes que codifican H2A.Z, son viables pero presentan severas alteraciones morfológicas (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). La localización de esta marca epigenética, ya sea en zonas de heterocromatina o de eucromatina, responde a las variaciones producidas en el entorno ambiental y se ha determinado la existencia de una relación directa entre el enriquecimiento de H2A.Z y la transcripción de determinados genes en varios organismos (Millar et al., 2006; Barski et al., 2007; Mavrigh et al., 2008; Draker y Cheung, 2009; Hardy et al., 2009; Wan et al., 2009; Sadeghi et al., 2011). Por este motivo, los mutantes *h2a.z* no reaccionan apropiadamente a las señales externas (Jackson y Gorovsky, 2000; Santisteban et al., 2000; Coleman-Derr y Zilberman, 2012).

Un aspecto común de la biología de animales y plantas es el aumento de H2A.Z en los pocos nucleosomas que flanquean los sitios de iniciación de la transcripción (Barski et al., 2007; Whittle et al., 2008; Zilberman et al., 2008; Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Estudios realizados en humanos, también demuestran una relación directa entre los elevados niveles de H2A.Z presentes en las regiones codificantes de los genes y el silenciamiento de la expresión de dichos genes (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Además, la eliminación de la variante H2A.Z del cuerpo del gen da lugar a la activación transcripcional de dicho gen (Hardy et al., 2009; Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Esta relación de H2A.Z con la regulación transcripcional supone una propiedad ancestral en eucariotas ya que se observa de la misma manera, en plantas



como en animales (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Por su parte, se ha demostrado que mutaciones ocasionadas en alguno de los componentes del complejo INO80 de levaduras, provocan reacciones opuestas respecto a la localización de H2A.Z (Papamichos-Chronakis et al., 2011). Es decir, en dichos mutantes esta marca es eliminada de las regiones de iniciación de la transcripción, mientras que es enriquecida en las regiones codificantes, sugiriendo que los complejos remodeladores de los nucleosomas compiten para dar forma a los patrones de expresión génica, mediante la disposición de la variante histónica H2A.Z en distintas localizaciones (Papamichos-Chronakis et al., 2011). El estudio de estos mecanismos de remodelación de cromatina, son claves para poder explicar procesos tan finamente regulados como la transición floral.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se ha profundizado en el papel que desempeñan los mecanismos de remodelación de la cromatina en el control de la transición floral y en otros procesos del desarrollo de las plantas, a través del estudio de las subunidades SWC6, SWC4 y YAF9, que podrían formar parte de los complejo SWR1 y NuA4, en *Arabidopsis*.

### **1. La proteína SWC6 en *Arabidopsis* participa en la represión de la transición floral a través de su participación en el complejo SWR1**

La proteína SWC6 de *Arabidopsis* se encuentra codificada por un gen único y es homóloga de las subunidades Swc6/Vsp71 y de SWC6/ZnF-HIT1, presentes en los complejos SWR1 de levaduras y humanos, respectivamente (March-Díaz y Reyes, 2009). El hecho de que mutantes de pérdida de función para *SWC6* no sean letales, como ocurre con las líneas de pérdida total de función de otros genes únicos del SWR1-C, como *SWC4*, indica que su función no es esencial para el desarrollo de la planta y que subunidad podría ser reemplazada por otras proteínas dentro de dicho complejo.

Los análisis genéticos de los alelos mutantes de *SWC6* realizados en este trabajo, demuestran que el fenotipo de floración temprana de *swc6* suprime el fenotipo de floración tardía tanto de los mutantes de la ruta autónoma como de las líneas que contienen un alelo funcional del locus *FRI* (Fig. 15; Tabla 10). Estas interacciones genéticas de *SWC6* con genotipos que tienen altos niveles de expresión de *FLC*, también se han comprobado para mutantes *pie1* y *esd1/arp6*, y tienen una correspondencia a nivel molecular, con la disminución de los niveles del mRNA de *FLC* observado en los mutantes del complejo SWR1 (Noh y Amasino, 2003; Choi et al., 2005,

2007; Martín-Trillo et al., 2006; March-Díaz et al., 2007; Lázaro et al., 2008). Por tanto, SWC6 se requiere para mantener altos los niveles de expresión de dicho represor floral. Además, el fenotipo más temprano revelado en los mutantes *swc6-1 flc-3*, comparado con el mutante *flc-3*, nos sugiere que SWC6 participa en el control del tiempo de floración a través de la regulación de otros genes represores (Lázaro et al., 2008) (Fig. 15; Tabla 10). Así, los resultados obtenidos de los análisis de expresión de distintos genes *MAF*, para los mutantes, *swc6*, *esd1/arp6* y para el doble mutante *swc6 esd1*, muestran una reducción en la expresión de los genes *MAF4* y *MAF5* (Fig. 15). Estos datos confirman la existencia de otros represores adicionales a *FLC*, que funcionan como dianas de SWC6. Por tanto, se puede concluir que SWC6 participa en el control del tiempo de floración de forma dependiente e independiente de *FLC*.

En levaduras se ha descrito que Swc6 y Arp6 son dos componentes íntimamente asociados en el SWR1-C e interaccionan físicamente entre sí (Wu et al., 2005). De acuerdo con esto, el fenotipo observado en plantas mutantes *swc6 esd1* de *Arabidopsis* es indistinguible de cualquiera de los dos mutantes simples, lo que sugiere la existencia de una interacción genética de ambos loci y la participación de dichos genes en la misma ruta genética, controlando procesos comunes (Fig. 16; Tabla 10) (Choi et al., 2007; Lázaro et al., 2008). Los ensayos de interacción que hemos llevado a cabo, confirman que las proteínas SWC6 y ESD1/ARF6 interaccionan físicamente, como se describe para el SWR1-C de levaduras (Wu et al., 2005) (Fig. 17 y 18). Estos datos apoyan una función coordinada de SWC6 y ESD1/ARF6 en el control de la transición floral y suponen una evidencia de la existencia de un complejo homólogo a SWR1 en *Arabidopsis* (Lázaro et al., 2008).

Como se ha definido en el presente trabajo, *SWC6* está implicado en la represión floral a través de la regulación de la expresión de *FLC* y es necesario para una correcta incorporación de las marcas de acetilación de H3K9 y H3K14 y de trimetilación de H3K4 en dicho locus, relacionadas con la activación transcripcional (Fig 19). Las mutaciones en *SWC6* provocan una disminución de los niveles de estas modificaciones histónicas en regiones específicas de la cromatina de *FLC*, reducción que también ha sido observada en los mutantes *esd1/arp6* (Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008) (Fig. 19), lo que sugiere, de nuevo, la relación de ambas proteínas en el control de la floración, a través de la regulación epigenética de *FLC*.

Recientemente se ha descrito que el homólogo de *SWC6* en *Drosophila* también es capaz de interaccionar funcional y físicamente con el factor de transcripción TFIIH,

involucrado en procesos de reparación del DNA (Herrera-Cruz et al., 2012), información puede abrir nuevas vías de estudio sobre el papel del SWR1-C en la modulación transcripcional o en los mecanismos de reparación del DNA (Jha et al., 2012). De hecho, existen evidencias que demuestran que el SRCAP-C de humanos, además de participar en el intercambio de la variante histónica H2A.Z, también interviene en la eliminación de histonas H2A.X fosforiladas, la variante homóloga a H2A de levaduras, de los sitios de rotura tras de la reparación del DNA. Estos hallazgos apoyarían el papel de SWR1/SRCAP y de TFIIH en la regulación de la transcripción y reparación del DNA.

## **2. La proteína SWC4 de Arabidopsis juega un papel esencial en la viabilidad de las plantas, formando parte de los complejos SWR1 y NuA4**

La proteína SWC4, al igual que SWC6, se encuentra codificada en Arabidopsis por un gen único. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con mutantes *swc6*, la pérdida de función de *SWC4* conlleva a un fenotipo de letalidad embrionaria, similar al observado en aquellas plantas donde se interrumpen otros genes como *ACT1*, *ARP4* o *RVB1* (Holt et al., 2002; Kandasamy et al., 2005a; March-Díaz y Reyes, 2009). En levaduras, estas subunidades forman parte de diversos complejos remodeladores de la cromatina. Así, Arp4 y Act1 se encuentran compartidas junto con Swc4/Eaf2 y Yaf9 en los complejos SWR1 y NuA4 y se ha descrito la unión de este subcomplejo al extremo amino-terminal de la subunidad catalítica Swr1 (March-Díaz y Reyes, 2009) (Fig. 5-6). Por su parte, Rvb1 junto con Act1, Arp4 y Rvb2 también se encuentran presentes en el complejo INO80 de levaduras (She et al., 2000). Es posible que el hecho de que estos genes participen en más de un complejo remodelador de cromatina, regulando diferentes procesos a nivel celular, sea la explicación del fenotipo de letalidad asociado a su pérdida de función.

La proteína SWC4 de Arabidopsis presenta un dominio SANT que constituye una región muy conservada en proteínas de otros organismos eucarióticos que, a menudo, están relacionadas con complejos remodeladores de cromatina (Fig.22) (Boyer et al., 2004; Evans-Roberts et al., 2010). En levaduras se ha descrito que la proteína Swc4 y en concreto, el dominio SANT, es esencial para la viabilidad, lo que corroboraría la letalidad ocasionada en plantas por la falta de función de esta proteína (Auger et al., 2008; Micialkiewicz y Chelstowska, 2008). Este dominio presenta una estructura muy similar a la que se observa en el dominio Myb de unión a DNA, caracterizado por contener tres triptófanos muy conservados en cada una de las alpha-hélices que lo componen (Fig.22) (Boyer et al., 2004; Evans-Roberts et al., 2010). En general, los

triptófanos presentes en la segunda y tercera hélice suelen ser sustituidos por otros aminoácidos aromáticos (Evans-Roberts et al., 2010), y esto mismo ocurre en el dominio SANT de SWC4 de Arabidopsis (Fig.22). En la proteína SWC4, la tercera hélice, descrita como la región fundamental para el reconocimiento de regiones específicas de DNA, en los dominios Myb, adopta un carácter más ácido por la sustitución de algunos residuos apolares por otros de carácter polar, lo que favorecería el reconocimiento de proteínas más básicas como las histonas (Boyer et al., 2004) (Fig.22). Estos datos apoyarían los resultados obtenidos en los ensayos de unión a histonas *in vitro* realizados, donde la proteína SWC4 se une preferentemente a las histonas H3, modificadas o no y a la histona H4 (Fig. 46). En cualquier caso, independientemente de la región por la que interactúe, estos datos sitúan a la subunidad SWC4 en un punto clave del reconocimiento de determinadas marcas epigenéticas a nivel histónico y en el anclaje de los complejos SWR1 y NuA4 en regiones concretas del genoma.

Ejemplos similares al fenotipo de letalidad mostrado por los mutantes *swc4*, los encontramos en plantas donde los genes *ARP4* y *AtTIP49/RVB1* se encuentran interrumpidos (Kandasamy et al., 2005a; Holt et al., 2002). Por su parte, el silenciamiento del gen *ARP4*, al igual que ocurre con el silenciamiento de *SWC4*, origina plantas que presentan alteraciones morfológicas como un menor tamaño de las anteras y de las silicuas, que contienen óvulos abortados y producen un menor número de semillas (Kandasamy et al., 2005a). En el caso de plantas heterocigotas *swc4/+*, aunque los granos de polen parecen ser viables (Fig. 28), la disposición de las semillas abortadas en las silicuas (Fig. 27) y los estudios realizados sobre la capacidad del alelo mutante para transferirse a la descendencia, nos llevó a concluir que defectos en el desarrollo del gametofito masculino, a nivel de la progresión del tubo polínico, podrían constituir la causa más probable de la producción de semillas abortadas, siendo por tanto la donación materna la única vía posible de transmisión del alelo mutante.

Entre las características comunes de las plantas *swc4i* y *tip49as*, se incluye la presencia de un rizamiento en las hojas, con márgenes desiguales que podría deberse a un crecimiento o desarrollo alterado de las células que forman estas hojas (Holt et al., 2002), como corroboran los experimentos realizados con plantas *swc4i*, donde se demuestra la existencia de defectos en la progresión del ciclo celular en las hojas de la roseta (Fig. 36, 40-41). Por su parte, al contrario de lo que se ha descrito en plantas *arp4i*, que presentan un menor número de hojas y florecen de forma más temprana que el silvestre, en condiciones de DL, el silenciamiento de *SWC4* no origina alteraciones en cuanto al tiempo de floración (Fig. 38). Aunque los análisis de expresión de plantas

*swc4i*, muestran un significativo aumento de la expresión de *FT* en condiciones de DC (Fig. 39), es posible que las importantes alteraciones provocadas en la planta a nivel del ciclo celular, alteren una correcta progresión del cambio de fase de meristemo vegetativo a reproductivo, afectando al inicio de la floración. Estos datos sugieren que las proteínas SWC4 y ARP4 junto con TIP49a/RVB1, deben confluir en la regulación de procesos similares del desarrollo, ya que los mutantes presentan alteraciones fenotípicas con algunas características comunes, pero a la vez deben actuar en la regulación de procesos diferentes, lo que es consistente con el establecimiento de una asociación de SWC4 con las subunidades catalíticas de los complejos SWR1 y NuA4, y la participación de ARP4 y TIP49a en otros complejos remodeladores diferentes, tal y como se ha descrito en levaduras (Holt et al., 2002; Kandasamy et al., 2005a, b; Zhuo et al., 2010).

Otra propiedad esencial de la proteína SWC4 es la presencia de un dominio DMAP1 muy conservado que presenta una gran homología con la proteína ortóloga descrita en humanos (Auger et al., 2008) (Fig. 23; Tabla 1). La proteína DMAP1 de humanos se localiza junto con DNMT1 y el complejo deacetilasa de histonas 2 (HDAC2) (Rountree et al., 2000; Mohan et al., 2011) y participa en el establecimiento de un estado transcripcionalmente reprimido, mediante el mantenimiento global de la metilación del DNA (Rountree et al., 2000; Auger et al., 2008; Lee et al., 2010; Shin et al., 2010). Además, DMAP1 también se encuentra localizada junto con PCNA1 y DNMT1 en el inicio de la replicación, durante la fase S, participando activamente en la reparación del DNA y en el control del ciclo celular en humanos (Rountree et al., 2000; Negishi et al., 2009; Shin et al., 2010). Cabe la posibilidad de que la proteína SWC4 en *Arabidopsis*, tenga igualmente afinidad por proteínas con actividad metiltransferasa de DNA, como MET1 (Deleris et al., 2012), conectando así, mecanismos de remodelación de cromatina, tales como el intercambio de variantes histónicas y mecanismos que modifican el estado de metilación del DNA.

El estudio de la regulación de procesos como la transcripción a través del intercambio histónico, ha puesto de manifiesto la existencia de una relación inversa entre los niveles de metilación del DNA, establecidos en ciertas zonas codificantes de los genes y la disposición de H2A.Z en estas regiones (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). De esta manera, la metilación del DNA, que clásicamente se ha considerado una marca de silenciamiento transcripcional, previene la incorporación de H2A.Z en la región codificante de genes que se expresan de forma constitutiva y esta variante histónica se localiza entonces en las regiones flanqueantes del gen, exclusivamente. Por el contrario,

en los genes sensibles a determinados estímulos, la activación transcripcional es promovida por un descenso de la metilación del DNA que permite la entrada de H2A.Z en la región codificante, marca que corresponde con una elevada variabilidad en los patrones de expresión de genes que responden a determinados estímulos, en los diferentes tejidos y en diferentes condiciones ambientales (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). La pérdida de función de H2A.Z en *Arabidopsis* da lugar a una deficiencia en la expresión de estos genes sensibles a estímulos, errores que se producen a pesar de que no se observan cambios en los patrones de metilación del DNA en estos mutantes. De esta manera, la homología presente entre la proteína SWC4 de *Arabidopsis* y la proteína DMAP1 de humanos, sugiere una posible participación de SWC4 en la regulación de la expresión génica relacionada con enzimas que modulan el estado de metilación del DNA. Por otro lado, las mutaciones causadas en la metiltransferasa de DNA, *MET1* de *Arabidopsis*, que provocan tanto la pérdida como la ganancia de metilación en ciertas regiones del DNA, originan cambios opuestos en los niveles de incorporación de H2A.Z (Zilberman et al., 2008). Sin embargo, en los mutantes *h2a.z*, apenas se ven alterados los niveles de metilación del DNA o los perfiles de esta metilación a lo largo de las regiones genómicas (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Estos datos suponen, que la relación inversa entre la metilación del DNA y la incorporación de H2A.Z está causada principalmente por la exclusión de H2A.Z del DNA metilado y puede influir en la estructura de la cromatina y en los efectos de silenciamiento génico por exclusión de la variante H2A.Z (Coleman-Derr y Zilberman, 2012).

Los estudios llevados a cabo con los complejos SWR1-C y NuA4-C de levaduras han demostrado una estrecha relación funcional entre ambos complejos, ya que participan en la remodelación de la cromatina de diferentes loci, permitiendo la eliminación de los nucleosomas de ciertas regiones y por lo tanto, facilitando la transcripción de estos (Altaf et al., 2010). Los complejos SWR1 y NuA4 se encuentran físicamente asociados en el complejo TIP60 descrito en *Drosophila* y en humanos (Cai et al., 2005). Este complejo tiene la capacidad de acetilar histonas e intercambiar H2A por H2A.Z en la cromatina, demostrando una conservación funcional en la fusión de ambos complejos (Doyon et al., 2004; Kusch et al., 2004; Auger et al., 2008). Recientemente se ha demostrado la importancia del NuA4-C en la acetilación de H4 y H2A para estimular la incorporación de H2A.Z mediante el SWR1-C (Altaf et al., 2010). Las mutaciones en las diferentes lisinas, susceptibles de ser acetiladas, tanto en la histona H4 como en H2A, presentan un efecto similar sobre el intercambio de H2A.Z (Altaf et al., 2010). Sin embargo, cuando se combinan estas mutaciones para H4 y para

H2A conjuntamente, el efecto es letal para las células (Altaf et al., 2010). Por tanto, la acetilación de H4 y H2A presenta una redundancia funcional sobre la activación de la incorporación de H2A.Z a la cromatina, aunque este intercambio también se puede activar de forma independiente de la acetilación de histonas por parte de NuA4-C, a través del SWR1-C (Altaf et al., 2010).

En levaduras, la proteína Bdf1, componente del SWR1-C, se asocia con H4 acetilada (H4Ac) *in vitro*, e interacciona funcionalmente con la subunidad Esa1, responsable de la acetilación global en las histonas H4 y H2A (Boudreault et al., 2003; Durant y Pugh, 2007; Altaf et al., 2010). Estudios recientes han demostrado que la asociación de Bdf1 al SWR1-C depende del subcomplejo formado por Arp4-Yaf9-Swc4-Act1, subunidades que son compartidas por el complejo NuA4 (Wu et al., 2009; Altaf et al., 2010). Una de las hipótesis aceptadas en la actualidad sobre el anclaje de estos complejos a la cromatina se basa en la capacidad de la proteína Bdf1 para reconocer patrones de acetilación de histonas, ya que los mutantes en esta subunidad del complejo presentan una disminución de la deposición de H2A.Z en las zonas promotoras (Raisner et al., 2005; Zhang et al., 2005). No obstante, en *Arabidopsis* no se ha identificado un ortólogo de Bdf1, puesto que en su genoma no se han descrito proteínas que contengan dos dominios de tipo bromodomain (Krogan et al., 2003; Kobor et al., 2004; Zhang et al., 2005). Estas observaciones, sumadas a los resultados obtenidos en este trabajo, nos conducen a pensar en la posible cooperación funcional de los complejos SWR1 y NuA4 en *Arabidopsis*. La letalidad inducida en las plantas por la pérdida de función de *SWC4*, *ACT1*, *ARP4* y *AtTIP49a/RVB1* (Holt et al., 2002; Kandasamy et al., 2005; March-Díaz y Reyes, 2009) podría deberse a defectos en la acetilación de H4 y H2A de forma simultánea, de manera que originen una gran desregulación génica, que impidan la viabilidad de la planta por los defectos producidos a nivel del desarrollo embrionario.

Otra marca asociada a la activación transcripcional de determinados genes es la acetilación de H2A.Z (AcH2A.Z) y presenta una distribución diferenciada de H2A.Z a lo largo del genoma de levaduras (Millar et al., 2006). La variante H2A.Z se localiza predominantemente en genes que son inactivos y se encuentra enriquecida a nivel de las regiones reguladoras. Sin embargo, la forma AcH2A.Z se encuentra presente en genes transcripcionalmente activos, que experimentan una pérdida considerable de los nucleosomas (Millar et al., 2006; Billon y Côté, 2012). Por ello se ha propuesto que, los complejos SWR1 y NuA4 interaccionarían funcionalmente sobre la variante H2A.Z, permitiendo un proceso dinámico, en el cual la incorporación de H2A.Z a la cromatina

sería regulada por la acetilación de otras histonas, promoviendo la transcripción a través de la acetilación de H2A.Z, que originaría un cambio en la estructura de la cromatina, liberando de nucleosomas las zonas susceptibles de ser reguladas transcripcionalmente (Guillemette y Gaudreau, 2006; Millar et al., 2006; Altaf et al., 2010).

Hasta el momento en *Arabidopsis* no se ha explorado en profundidad si la proteína SWC4 podría estar implicada directamente en procesos de metilación del DNA, en la acetilación de H4, H2A y H2A.Z, o en la incorporación de la variante histónica H2A.Z a la cromatina de ciertos loci en función de los estímulos recibidos por la planta, si bien se puede prever que este será un campo de investigación en el que se avanzará de manera considerable en los próximos años, dada la relevancia del tema.

### **3. Los mutantes *yaf9a yaf9b* presentan alteraciones fenotípicas severas, incluyendo un fenotipo de floración temprana**

La proteína homóloga a YAF9 en *Arabidopsis* está codificada por dos genes, *YAF9A* y *YAF9B* (Fig. 53). Ambos genes codifican proteínas que presentan gran similitud de secuencia con la subunidad Yaf9 del complejo SWR1 y con la proteína TAF14 de levaduras, respectivamente (Fig. 48). Sin embargo, según los datos obtenidos en este trabajo hemos observado, que en el caso de *YAF9B*, esta proteína presenta una mayor homología con las secuencias de proteínas Yaf9 presente en distintas especies de levaduras que con la proteína TAF14, si la comparamos con otras proteínas con un dominio YEATS, en estas especies (Fig.48). Es más, las secuencias de *YAF9A* y *YAF9B* de *Arabidopsis* presentan importantes homologías a nivel de la caja A del extremo C-terminal, sugiriendo que *YAF9B* es un gen homólogo de *YAF9A* y no un ortólogo de la proteína Taf14 de levaduras (Zacharaki et al., 2012) (Fig.48).

Por su parte, los genes *YAF9A* y *YAF9B* revelan cierta redundancia funcional, ya que el fenotipo de floración temprana originado por la pérdida de *YAF9A* parece acrecentarse cuando se elimina también *YAF9B* (Fig. 53-56). Dado que la mutación identificada para *YAF9B* no elimina totalmente la expresión de su mensajero, podría justificar que fuese un alelo hipomórfico, con un fenotipo similar al silvestre y además, podría explicar la viabilidad de las plantas *yaf9a yaf9b* (Fig. 56). El fenotipo de floración temprana observado en *yaf9a* está respaldado por los datos obtenidos en los análisis de expresión de los genes de floración analizados. Por contra, el doble mutante *yaf9a yaf9b* presenta un notable descenso de la expresión de *FT* en condiciones de DL, que no corresponde con el fenotipo de floración temprana mostrado por estas plantas (Fig. 61).



Estos datos sugieren que es la pérdida de función de *YAF9B* combinada con la mutación *yaf9a*, la responsable del descenso de la expresión de *FT* dependiente del fotoperiodo, ya que en mutantes para *YAF9A*, la expresión de *FT* se mantiene elevada y en mutantes *yaf9b* los patrones de expresión tanto de *FT* y *FLC* no varían, siendo idénticos a los mostrados por plantas silvestres. Hasta el momento los mecanismos por los cuales *YAF9B* interviene en la regulación del tiempo de floración, aún no se conocen.

Estudios publicados recientemente con mutantes *yaf9a* han demostrado que la pérdida de función de *YAF9A* origina una reducción en los niveles de acetilación de H4, en la región promotora y el primer intrón de *FLC*, que corresponde con el descenso de la expresión de este gen, corroborando el fenotipo de floración temprana presente en estos mutantes (Zacharaki et al., 2012). Estos datos corroborarían nuestras observaciones realizadas bajo condiciones de DL, donde *YAF9A* parece funcionar como un regulador positivo de la expresión de *FLC*, posiblemente controlando los niveles de acetilación de H4 en este locus (Zacharaki et al., 2012).

Por otro lado, la pérdida de función de *YAF9A* provoca un aumento en la acetilación de H4 en el primer y segundo exón y en el primer intrón de *FT*, diferencias que se corresponden con el aumento en los niveles de expresión de este gen en el mutante *yaf9a* (Zacharaki et al., 2012). En este trabajo, hemos demostrado que la expresión de *FT* en el mutante *yaf9a* es elevada, de manera similar a lo que ocurre en las plantas *swc4i* que también presentan un significativo aumento de la expresión de *FT*, particularmente en condiciones de DC (Fig. 39). Todas estas observaciones sugieren que el subcomplejo SWC4-YAF9A podría estar regulando negativamente la expresión de *FT*, como componente del NuA4-C, ya que el aumento de expresión de dicho locus, en los mutantes *yaf9a* se relaciona de una forma directa con el aumento de los niveles de acetilación de H4 en su cromatina (Zacharaki et al., 2012). La caracterización de dobles mutantes *yaf9a ft-2*, cuyo fenotipo de floración es similar al de su parental *ft-2*, sugiere que el fenotipo de floración acelerada de *yaf9a* requiere de un gen *FT* funcional (Zacharaki et al., 2012). Los efectos de la mutación *yaf9a* sobre la acetilación de H4 en la cromatina de los loci *FLC* y de *FT* (Zacharaki et al., 2012) podrían ser debidos a una disfunción del NuA4-C específica sobre estos genes, demostrando la participación de *YAF9A* como componente de SWR1-C y posiblemente del NuA4-C de Arabidopsis, en el control de la iniciación de la floración (Zacharaki et al., 2012). Por tanto, *YAF9A* participa en la regulación de la transición floral mediante la activación transcripcional de *FLC* y la

represión del integrador floral *FT*, mediante mecanismos epigenéticos que implican tanto el intercambio de variantes histónicas como la acetilación de histonas particulares.

La interacción de YAF9A y YAF9B con diferentes histonas presentes en la cromatina de *Arabidopsis*, viene corroborada por la presencia del dominio YEATS (Fig. 47) y por las observaciones realizadas en este trabajo (Fig. 74). El dominio YEATS adopta una conformación similar a la presente en las inmunoglobulinas, que también se encuentra en otras proteínas de *Arabidopsis*, como ASF1, una chaperona de histonas H3-H4 implicada en procesos de replicación del DNA (Wang et al., 2009b) (Fig. 47). Se ha propuesto que la conformación del dominio YEATS proporciona una plataforma para la unión de muy diversas proteínas (Wang et al., 2009b). De hecho, los ensayos de unión a histonas llevados a cabo en este trabajo han permitido demostrar la unión *in vitro* de las histonas H3 y H4 con las proteínas YAF9A y YAF9B, las únicas proteínas presentes en *Arabidopsis* con un dominio YEATS (Choi et al., 2011) (Fig. 74). Por otro lado, el fenotipo resultante de la pérdida de función conjunta de YAF9A y YAF9B presenta similitudes con el fenotipo observado en los dobles mutantes *asf1a asf1b*, que muestran un retraso en la progresión del ciclo celular, causado probablemente por anomalías durante el proceso de ensamblaje de los nucleosomas (Zhu et al., 2011). Estos datos son corroborados, en cierta medida, por los ensayos de citometría y los resultados obtenidos de los análisis transcriptómicos realizados con los mutantes *yaf9a yaf9b* que presentan una posible inhibición de la entrada al endociclo y un aumento de la expresión de genes implicados en la iniciación de la replicación del DNA (Gutierrez, 2005, Ramírez-Parra y Gutierrez, 2007) (Tabla 11), datos que justifican una reducción en la expansión de la célula y un tamaño más pequeño de órganos como la raíz, hojas y flores en los mutantes *yaf9a yaf9b* (Fig. 56, 58-59, 63-64). Por tanto, la reducción en el tamaño de las plantas *yaf9a yaf9b* y un característico rizamiento de las hojas (Fig. 56) podría estar causado por la participación de las proteínas YAF9A y YAF9B en la regulación del ciclo celular, a través de mecanismos que afectan a la estructura de la cromatina.

Algunas de las características fenotípicas observadas en los mutantes *yaf9a yaf9b* también se encuentran presentes en plantas *swc4i*, como el fuerte rizamiento de las hojas o el menor tamaño de las mismas y una reducción en la longitud de la raíz, provocadas por defectos en la progresión del ciclo celular (fig. 36-37, 40). La demostración de la interacción física entre YAF9A y SWC4, tanto *in vivo* como *in vitro*, y que esta interacción ocurre en el núcleo de las células vegetales (Fig. 69-71), sugiere

que ambas subunidades juegan un papel clave en el reclutamiento de los complejos SWR1 y NuA4, en determinadas regiones de la cromatina.

Otra evidencia más de la existencia de un complejo remodelador de la cromatina común en plantas, es la interacción física observada entre las proteínas YAF9A y SWC6 (Fig. 73). Hemos demostrado que el dominio YEATS de la proteína YAF9A es el responsable de la interacción con AtSWC6 (Fig. 73), corroborando la función característica de este dominio como plataforma de unión para otras proteínas. Por otro lado, la proteína AtYAF9A interactúa a través de la caja B/CC en el extremo carboxilo-terminal, con SWC4, siendo necesaria la integridad del dominio DMAP1 para esta unión (Fig. 70). Luego, diferentes dominios de la proteína YAF9A están implicados de manera diferencial en la interacción con otras subunidades del complejo SWR1.

Todos estos datos aportan una prueba más de la implicación que presentan las proteínas YAF9A, YAF9B y SWC4 en el control de diferentes procesos de desarrollo, formando parte de un complejo proteico común. La pérdida de función de YAF9A, YAF9B y SWC4 podría originar alteraciones en el acoplamiento de los complejos SWR1 y NuA4 sobre las histonas H3 y H4, además de causar un descenso en la incorporación de H2A.Z en determinados genes, afectando al ensamblaje de los nucleosomas y al correcto estado de compactación de la cromatina. Esto explicaría las alteraciones observadas en plantas deficientes en dichas subunidades a nivel de la expansión celular, que coinciden con el menor tamaño de la planta en general y en el caso de la ausencia total de SWC4, provoca graves deficiencias a nivel del desarrollo embrionario, dando lugar a un fenotipo letal. En definitiva, el descubrimiento de las diversas conexiones establecidas entre estas proteínas objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, pone de manifiesto la cooperación de los complejos SWR1 y NuA4 en el núcleo de las células, para participar en determinadas modificaciones epigenéticas que permitan la regulación de procesos como la replicación o la transcripción del DNA.

Gracias a los diversos estudios de pérdida de función de H2A.Z se ha podido determinar una serie de procesos en los que esta variante histónica se encuentra implicada. Además de la regulación de la transcripción, la variante histónica H2A.Z también participa en otros procesos celulares, como el mantenimiento y la integridad del genoma (Billon y Côté, 2012). Además, H2A.Z interactúa con factores que son necesarios para la segregación cromosómica y la citocinesis, previene la compactación de la cromatina, e interviene en el mantenimiento de la integridad de los centrómeros y telómeros (Babiarz et al., 2006; Ahmed et al., 2007; Greaves et al., 2007; Hou et al.,

2010; Billon y Côté, 2012). También se ha propuesto un papel para H2A.Z en la replicación del DNA, ya que interacciona físicamente con la proteína ORC1 y genéticamente con otros factores ORC1-like, ORC5 y PCNA (Dhillon et al., 2006). Adicionalmente, estudios realizados en *Arabidopsis*, revelan la localización de H2A.Z en el origen de replicación (Costas et al., 2011) y es una marca epigenética necesaria para la activación del punto de control en la fase S del ciclo celular, por lo que se encuentra implicada en la respuesta a daños en el DNA producidos por estrés replicativo (Billon y Côté, 2012). Por tanto, la remodelación de la cromatina es fundamental además, en procesos de reparación del DNA, facilitando el acceso de diferentes complejos a los sitios de rotura de la doble cadena. Así, otra interesante observación es la participación de la subunidad Arp4 en los complejos SWR1, INO80 y NuA4 de levaduras y su implicación en la reparación de daños en el DNA, mediante la interacción con H2A fosforilada (Billon y Côté, 2012; Xu et al., 2012). Como se ha mencionado anteriormente, SWC6 también está relacionada con procesos de reparación del DNA en humanos (Herrera-Cruz et al., 2012). Estos mecanismos de remodelación y reparación del DNA requieren del aumento de histonas acetiladas que activen la incorporación de H2A.Z, promoviendo la apertura de la cadena de DNA y una estructura más relajada de la cromatina (Xu et al., 2012). La acetilación y ubiquitinación de H2A.Z permiten el reclutamiento de la maquinaria de reparación, como el BRCA1-C y las proteínas Ku70 y Ku80, en los sitios específicos de rotura de la doble cadena de DNA (Lukas et al., 2011; Xu y Price, 2011). Todas estas observaciones han permitido esclarecer los mecanismos moleculares implicados en la remodelación de la estructura de la cromatina, en los sitios de rotura de la doble hélice y revelan que una serie de eventos, incluidos el intercambio de H2A.Z, la acetilación de histonas y la ubiquitinación de la cromatina, funcionan conjuntamente para crear una cromatina abierta, con una estructura más relajada que pueda acetilarse en los sitios donde se han producido daños en el DNA (Xu et al., 2012). Finalmente, el intercambio de H2A.Z estimulado por la acción de NuA4-C promueve la reorganización de la arquitectura de la cromatina para crear un molde que suponga un sustrato eficiente para la maquinaria de reparación (Billon y Côté, 2012; Xu et al., 2012).

Mediante el análisis de los perfiles transcriptómicos globales llevados a cabo con plantas *yaf9a yaf9b*, se ha establecido la existencia de un solapamiento del 27% de los genes que se encuentran desregulados en el doble mutante *yaf9a yaf9b*, con el mutante *h2a.z*, y del 11% con plantas *pie1* (Fig. 68) (March-Díaz et al., 2008; Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Este resultado indica que PIE1 y H2A.Z comparten funciones en la regulación de la expresión génica con YAF9, aunque también presentan un grado de independencia funcional, y de hecho, no se puede descartar que PIE1 tenga funciones

independientes del complejo SWR1, en el control de la expresión génica (Noh y Amasino, 2003). Además, aunque YAF9 puede intervenir en procesos comunes de regulación con SWR1-C y PIE1, también está implicado en la regulación de otros procesos relacionados con la incorporación de H2A.Z, independientes de PIE1. Por otro lado, tan solo un 33% de los genes desregulados en plantas *hta9 hta11* coinciden con los genes desregulados en *h2a.z*, lo que sugiere una cierta redundancia funcional entre los tres miembros de H2A.Z de Arabidopsis, que se pone de manifiesto al eliminar el gen *HTA8* y evidencia la importancia de esta subunidad en el funcionamiento e incorporación de esta variante histónica en la cromatina, en ausencia de las otras dos variantes de H2A.Z de Arabidopsis.

#### **4. Participación de las subunidades SWC6, SWC4 y YAF9 en los complejos SWR1 y NuA4 y su posible implicación en la regulación de la transición floral y otros procesos del desarrollo**

Los resultados presentados en este trabajo han contribuido a la identificación y caracterización funcional en Arabidopsis de los ortólogos *SWC6*, *SWC4* y *YAF9*, componentes del complejo SWR1 de levaduras, implicado en la regulación de la transición floral a través del intercambio de H2A por la variante histónica H2A.Z (March-Díaz y Reyes, 2009). El genoma de Arabidopsis presenta ortólogos para la mayor parte de los componentes de este complejo, por lo que la caracterización de *SWC6*, *SWC4* y *YAF9* junto con la identificación previa de otras subunidades, como *PIE1*, *RVB1*, *ARP4*, *ACT1* o *ESD1/ARP6*, apoya la existencia de un posible complejo homólogo de SWR1 en plantas (Holt et al., 2002; Noh y Amasino, 2003; Martín-Trillo et al., 2006; Choi et al., 2007; March-Díaz et al., 2007; Lázaro et al., 2008; Zacharika et al., 2012).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que tanto los mutantes *swc6* como *yaf9a*, así como el doble mutante *yaf9a yaf9b*, presentan un fenotipo de floración temprana (Fig. 11 y 56). Además, estos mutantes, junto a las plantas *swc4i*, presentan un alto grado de pleiotropía (Fig. 11-12, 36 y 56). Estas características, sumadas al patrón de expresión ubicuo que muestran *SWC6*, *SWC4* y *YAF9* (Fig. 8-9, 24, 49-50), sugieren una participación de dichos genes en multitud de procesos, implicados tanto en el desarrollo vegetativo como reproductivo de la planta. Alteraciones fenotípicas similares se han observado en otros mutantes tempranos, como *esd1/arp6*, *ebs*, *esd7* o *hos1*, caracterizados con anterioridad en nuestro laboratorio (Pineiro et al., 2003; March-Díaz et al., 2007; del Olmo et al., 2010; Lázaro et al., 2012).

El hecho de que el patrón de expresión de los genes *SWC6*, *YAF9A*, *YAF9B*, *PIE1* y *ESD1/ARP6* sea similar, junto a las características análogas presentadas por los mutantes *swc6*, *yaf9a yaf9b* y *pie1* y *esd1/arp6*, apoyaría la idea de una participación de dichos loci en la misma ruta genética, formando parte del mismo complejo proteico SWR1 en plantas. Además, *SWC6* y *YAF9A* presentan una expresión diferencial, que se podría explicar por la presencia de varios elementos *cis* (AGAAA y GTGA) en la región promotora de estos genes, responsables de la expresión específica en anteras y polen (Fig. 9, 50) (Gupta et al., 2007; Lázaro et al., 2008). Otros elementos comunes para los promotores de ambos genes es la presencia de secuencias de unión al factor GT-1, una proteína relacionada con la respuesta a la luz, y elementos de respuesta a factores MYB (Fig. 9, 50). Por tanto, es posible que *SWC6* y *YAF9A* además de intervenir en el control de la transición floral, tengan una función adicional en el desarrollo de anteras y/o polen. Por su parte, aunque *SWC4* presenta patrones de expresión ubicuos similares a los mostrados por *SWC6* y *YAF9*, las plantas *swc4i* no presentan características similares respecto al fenotipo de floración mostrado en mutantes *swc6* y *yaf9a yaf9b*, probablemente debido al carácter esencial de este gen para la supervivencia de la planta, produciendo la mutación de *SWC4*, un efecto letal en estadios iniciales del desarrollo.

Las características fenotípicas mostradas por los mutantes *swc6*, *yaf9a* y *yaf9a yaf9b*, solapan en gran medida con las desarrolladas por otros mutantes del SWR1-C, descritos en *Arabidopsis* (March-Díaz y Reyes, 2009). Los mutantes *swc6*, *yaf9a* y *yaf9a yaf9b*, al igual que los mutantes *esd1/arp6*, *pie1 arp4i* y *hta9 hta11*, presentan un fenotipo de floración temprana y similares alteraciones del desarrollo a nivel de la hoja y de la flor (Fig. 11-12, 56, 58), sugiriendo que todos ellos participan en procesos comunes de regulación del desarrollo de la planta, formando parte del mismo complejo proteico SWR1 (Noh y Amasino, 2003; Choi et al., 2005, 2007; Kandasamy et al., 2005a; Martín-Trillo et al., 2006; March-Díaz et al., 2007). No obstante, estos mutantes también presentan algunas particularidades que iremos discutiendo a lo largo de este apartado.

La mutación *swc6*, al igual que *pie1* y *esd1/arp6*, origina una supresión del fenotipo de floración tardía observado tanto en los mutantes de la ruta autónoma como en líneas que contienen alelos activos *FRI*, y exhiben otros defectos del desarrollo, como la presencia de los márgenes de las hojas aserrados, la pérdida de la dominancia apical, la presencia de pétalos extras en las flores y de silicuas más pequeñas (Fig. 15-16) (Noh y Amasino et al., 2003; Choi et al., 2005, 2007; Martín-Trillo et al., 2006; March-Díaz et al.,

2007; Lázaro et al., 2008). A pesar de estas similitudes a nivel fenotípico, la ausencia de *PIE1* y de *SWC6* no origina un fenotipo idéntico. De hecho, la mutación *pie1* provoca un fenotipo más severo y causa alteraciones morfológicas que no se observan en los mutantes *swc6*, como una mayor reducción en la elongación de la inflorescencia primaria y la presencia de hojas más pequeñas y deformadas (Noh y Amasino, 2003; March-Díaz et al., 2007). Este fenotipo más dramático ocasionado por la pérdida de *PIE1*, coincide con la posible pérdida de funcionalidad de la subunidad catalítica ATPasa del SWR1-C, frente a la pérdida de subunidades accesorias como *SWC6* (March-Díaz y Reyes, 2009), aunque no se puede descartar que *PIE1* participe en otros complejos de remodelación de cromatina con funciones diferentes a SWR1-C.

El fenotipo de floración más acusado mostrado por los mutantes *pie1* (Noh y Amasino, 2003), corresponde con una mayor reducción de los niveles de expresión de *FLC* y *MAF4*, comparado con lo observado en las plantas mutantes *swc6* y *esd1/arp6* (Deal et al., 2007; March-Díaz et al., 2007). En cambio, el gen *MAF5* está desregulado de igual forma en los tres mutantes (Martín-Trillo et al., 2006; March-Díaz et al., 2007). Estas observaciones demuestran la importancia de *PIE1* en el desarrollo de la planta y su posible participación en otros procesos, de una forma parcialmente independiente de *SWC6* y *ESD1* (Noh y Amasino, 2003; Martín-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008). En el caso de los dobles mutantes *yaf9a yaf9b* también se observa una reducción en los niveles de expresión de *FLC* en condiciones de fotoperiodo no inductivo, que se correlaciona igualmente con el tiempo de floración acelerado de estos mutantes (Fig. 62). Estos datos sugieren que los genes *YAF9* desempeñarían un papel similar al mostrado por *SWC6* y *PIE1* en la regulación de la expresión de *FLC*.

La caracterización de mutantes *h2a.z*, ha permitido desvelar la implicación de la variante histórica H2A.Z en la regulación de la floración en *Arabidopsis* (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Al igual que los mutantes descritos para el SWR1-C, los mutantes *h2a.z* sufren una aceleración en el tiempo de floración y exhiben menor tamaño de algunos órganos como flores, hojas y silicuas, márgenes aserrados de las hojas y un número extra de pétalos en las flores (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Sin embargo, las severas alteraciones originadas en mutantes *h2a.z pie1*, que hacen a la planta inviable, demuestran que, aunque H2A.Z y *PIE1* puedan participar en procesos de regulación comunes, no tienen una función completamente redundante en la regulación del desarrollo de *Arabidopsis* (March-Díaz et al., 2008; Coleman-Derr y Zilberman, 2012). De forma similar, el fenotipo causado por la pérdida de función de *SWC6* y de *YAF9A* y *YAF9B*, sugiere que estas subunidades forman parte del complejo SWR1 de

Arabidopsis, aunque no afecta a la total funcionalidad del complejo, ya que el fenotipo mostrado por estos mutantes no alcanza la severidad de las características mostradas por *pie1* o *h2a.z pie1*, que suponen la eliminación parcial o total, respectivamente, de la incorporación de H2A.Z (Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Estos datos revelan la posible existencia de otros complejos en Arabidopsis implicados en el intercambio de la variante histórica H2A.Z y en la regulación transcripcional y la posible participación de PIE1 en otros complejos remodeladores de cromatina, independientemente de SWC6 y de YAF9.

La caracterización funcional de de las subunidades SWC6 y YAF9 ha permitido desvelar el papel que juegan diferentes modificaciones epigenéticas en la regulación de la expresión de *FLC*, *FT* y *SOC1*, así como avanzar en el conocimiento de los procesos de remodelación de cromatina, involucrados en la regulación de la transición floral en Arabidopsis. El análisis global de determinadas marcas epigenéticas como la acetilación de H3K9, la dimetilación de H3K9, la trimetilación de H3K27, el intercambio histórico de H2A.Z y la metilación del DNA, ha permitido establecer una relación directa entre múltiples modificaciones en la cromatina con variaciones en la expresión génica (Zhou et al., 2010). Así, la marca Ach3K9 se asocia a un estado activo de la transcripción, y cuando se combina con otras marcas como H3K27me3 o la metilación del DNA, éstas prevalecen, anulando la acción de Ach3K9 y reprimiendo la transcripción (Zhou et al., 2010). De esta manera, se ha podido determinar que tanto SWC6 como YAF9A ejercen una función como represores de la floración, ya que promueven la expresión génica de *FLC*, y se requieren para la acumulación de determinadas marcas epigenéticas, clásicamente relacionadas con la activación transcripcional, en la cromatina de dicho locus (Lázaro et al., 2008; Zacharika et al., 2012). Estos datos sugieren un posible reclutamiento de NuA4-C, o complejos con actividad metiltransferasa sobre la cromatina de *FLC*, a través de las proteínas SWC6 y YAF9A que provocando la acetilación global de las histonas H3 y H4, la metilación de H3 y la posible acetilación específica de H2A.Z, después que haya sido introducida en la cromatina (Lázaro et al., 2008; Zhou et al., 2010; Valdés-Mora et al., 2012 Zacharika et al., 2012). Sería interesante determinar si otras marcas epigenéticas que se encuentran presentes en el locus *FLC*, además de las analizadas, podrían verse afectadas por la ausencia de función de *YAF9A* y *YAF9B*, en plantas dobles mutantes *yaf9ayaf9b*.

Además de la regulación epigenética de *FLC*, los mecanismos de remodelación de la cromatina controlan al integrador floral *FT* (Farrona et al., 2008; Adrian et al., 2010) que supone un importante punto de convergencia de diferentes señales ambientales,



por lo que se encuentra fuertemente regulado. A partir del estudio de mutantes *yaf9a* se ha sugerido que la proteína YAF9A podría funcionar como un represor de la expresión de *FT*. Sin embargo, los resultados obtenidos Zacharika y colaboradores (2012), que describen un aumento en la acetilación de H4 en la cromatina de *FT*, también podrían ser consecuencia de la inactivación de *FLC*, permitiendo la activación de los integradores florales y la floración (Adrian et al., 2010). En definitiva, los mutantes *swc6*, *esd1/arp6* y *yaf9a yaf9b* presentan un fenotipo de floración temprana inducido en último término por la alteración de determinadas marcas epigenéticas responsables de la regulación transcripcional de los genes de floración *FLC* y de *FT*.

Recientemente se han caracterizado en *Arabidopsis* dos genes, *HAM1* y *HAM2*, que codifican proteínas con actividad metiltransferasa de histona, y que son posibles ortólogos de la subunidad catalítica de NuA4-C, Esa1 (Xiao et al., 2013). Esta subunidad es responsable de la acetilación global de H4 y H2A y de la acetilación específica de H4K5 (H4K5Ac) en levaduras (Durant y Pugh, 2007; Altaf et al., 2010). Se ha demostrado que ambas proteínas HAM en *Arabidopsis* son funcionalmente redundantes, y son necesarias para el control de la floración, a través de la regulación epigenética de los represores *FLC*, *MAF3* y *MAF4* (Xiao et al., 2013). Al igual que se observa en plantas *yaf9a yaf9b*, las plantas con *HAM1* y *HAM2* silenciados (*amiRNA-HAM1/2*) presentan un fenotipo de floración temprana y desarrollan una reducción importante en la fertilidad, de forma similar a plantas *swc4i*, (Latrasse et al., 2008; Xiao et al., 2013). Por el contrario, la sobreexpresión de *HAM1* origina un fenotipo de floración tardía, efecto que no se ha observado en el caso de plantas sobreexpresoras de *SWC4* (Fig.45), o de *YAF9A* (datos no mostrados), posibles componentes del NuA4-C. Es interesante resaltar que los mutantes *amiRNA-HAM1/2* también presentan una reducción en los niveles de la histona H4 acetilada y de H4K5Ac alrededor del sitio de iniciación de la transcripción de *FLC* y de los genes *MAF3* y *MAF4*, datos opuestos a los observados en plantas sobreexpresoras de *HAM1*, coincidiendo con su fenotipo de floración tardía (Xiao et al., 2013). Estos resultados corroboran la posible existencia de un NuA4-C en plantas, formado entre otros por proteínas como *SWC4*, *YAF9A* y *HAM1* y *HAM2*, que participaría en la regulación positiva de la expresión de *FLC*, mediando la acetilación de histonas en dicho locus y reprimiendo la floración.

El análisis de las interacciones físicas que se producen entre las proteínas ortólogas de SWR1-C en *Arabidopsis*, proporciona una evidencia más de la existencia de un complejo similar, conservado en plantas (March-Díaz y Reyes, 2009). A partir de estos análisis se ha demostrado la interacción directa de la subunidad PIE1 con AtARP6

y AtSWC6 a través del dominio ATPasa de la subunidad catalítica (Choi et al., 2007, March-Díaz et al., 2007; Lázaro et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado la interacción específica de HTA8, HTA9 y HTA11 con el extremo amino terminal de PIE1 (March-Díaz et al., 2008). Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran la existencia de interacciones entre las proteínas AtSWC6 y ESD1/ARP6 (Fig. 17-18) y de AtSWC4 con AtYAF9A (Fig. 69-71), interacciones que previamente ya habían sido descritas para el complejo SWR1 en levaduras. Además, en este trabajo hemos demostrado otras interacciones que no habían sido descritas anteriormente y que consisten en la unión de AtSWC6 a las subunidades AtYAF9A y AtSWC4 (Fig. 72-73). Estas interacciones ponen de manifiesto el papel relevante de las subunidades SWC6 y YAF9, junto con ARP6 y PIE1 en la incorporación de H2A.Z a la cromatina de los genes diana. La interacción de AtSWC6 y AtYAF9A con la subunidad AtSWC4 subraya la existencia de la cooperación de SWR1-C con otros complejos remodeladores de la cromatina, como NuA4-C, participando en procesos comunes tales como la regulación de la transcripción y la progresión del ciclo celular (Auger et al., 2008; Altaf et al., 2010; Billon y Côté, 2012). Igualmente, estas interacciones sugieren una posible participación tanto de SWC6, ESD1/ARP6 y SWC2 como de YAF9A y SWC4 en el reclutamiento de H2A.Z por parte del SWR1-C (Choi et al., 2007; Deal et al., 2007; Zhou et al., 2010).

Las interacciones observadas entre las distintas subunidades de SWR1-C y las diferencias fenotípicas presentes en los mutantes *swc6*, *yaf9a yaf9b* y *swc4i* nos plantea la posibilidad de que SWR1-C y NUA4-C funcionen de forma conjunta, participando en una gran variedad de procesos necesarios para el normal funcionamiento y desarrollo de las plantas. Pero todavía no se conocen los mecanismos por los que estos complejos son reclutados específicamente a determinados genes.

Los trabajos publicados a lo largo de los últimos años han desvelado algunas claves en la regulación de *FLC*, mediada por H2A.Z, y a través del FRI-C, la ruta autónoma, la ruta de la vernalización y el complejo PAF1, y su relación con las diversas modificaciones epigenéticas originadas en su cromatina (He et al., 2003, 2004; Ausin et al., 2004; Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004; He y Amasino, 2005; Kim et al., 2005; Choi et al., 2011). En concreto, se ha demostrado la localización de H2A.Z en la zona de inicio y final de la transcripción de *FLC*, *MAF4* y *MAF5* (Deal et al., 2007) corroborando la participación del complejo SWR1 en el control del tiempo de floración a través de la activación de la expresión de estos represores florales (Deal et al., 2007). Por otro lado, los mutantes *esd1/arp6* y *pie1* presentan un descenso en la acumulación de H2A.Z en la cromatina de *FLC*, que además está relacionado con una reducción de

la expresión de este gen y con una aceleración del tiempo de floración (Deal et al., 2007). Igualmente, se ha descrito mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, que tanto SWC6 como ESD1/ARP6 se unen a las regiones reguladoras presentes en el promotor de *FLC* (Choi et al., 2007). De forma adicional, H2A.Z interacciona físicamente con las subunidades PIE1, AtSWC2 y ESD1/ARP6, y la reducción de la expresión de los genes que codifican para H2A.Z provocan un fenotipo similar al que se observa en los mutantes *swc6*, *esd1/arp6* y *pie1* (Choi et al., 2007; Deal et al., 2007; March-Díaz et al., 2008; Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Por lo tanto, estas evidencias apoyan el papel fundamental del complejo SWR1 en la incorporación de H2A.Z en la cromatina de *FLC*, y posiblemente en otros represores florales, permitiendo la activación transcripcional.

Además de las interacciones físicas establecidas entre los componentes del SWR1-C, son varias las conexiones que se han establecido entre los complejos SWR1, FRI, PAF1 y la proteína SDG8/EFS para participar conjuntamente en el mantenimiento de una elevada expresión de *FLC* (Ko et al., 2010; Choi et al., 2011). Existen diversas subunidades del SWR1-C que conecta con el FRI-C (Choi et al., 2011). Entre ellas, se encuentra la unión de YAF9A a la subunidad FLX, SWC6 que interacciona con FLX y SUF4 y, RVB1 que interacciona con FLX, SUF4, FES1 y FRI. Además, se han descrito interacciones de YAF9B con todos los componentes del FRI-C (Choi et al., 2011). En otros trabajos, se ha sugerido que *YAF9B* podría estar codificando una proteína ortóloga del factor de transcripción, Taf14 presente en levaduras (Choi et al., 2011). Esta proteína forma parte de varios complejos diferentes, de los que cuatro de ellos son complejos remodeladores de cromatina, denominados complejos SWI/SNF2, INO80, RSC y NuA3 (Schulze et al. 2009) Igualmente Taf14 participa en los complejos TFIID y TFIIF, que son factores generales de transcripción (Kabani et al., 2005; Schulze et al. 2009). Sin embargo, nuestros análisis indican que YAF9B parece encontrarse más próximo a la proteína Yaf9, según la homología de su secuencia proteica (Fig.48).

La proteína AtYAF9A que podría formar parte de los complejos SWR1 y NuA4 sugeridos en *Arabidopsis*, también interacciona con el FRI-C, a través de la subunidad FLX (Choi et al., 2011). Estudios recientes revelan que la mutación *flx* no afecta a los niveles de H4Ac en la región promotora de *FLC*, por lo que se ha sugerido que AtYAF9A podría interaccionar de manera adicional con otros componentes del complejo que medien la incorporación de H4Ac en dicho locus (Choi et al., 2011; Zacharaki et al., 2012). Este es el caso de las proteínas FES, VIP5 y SDG8/EFS, cuyos mutantes de pérdida de función reflejan un descenso de esta marca en la cromatina de *FLC*

(Zacharaki et al., 2012). Sin embargo, es probable también, que la alteración en los niveles de H4Ac en la región de *FLC* venga determinada por defectos en el ensamblaje del complejo NuA4, impidiendo su correcto funcionamiento y disminuyendo la H4Ac en la cromatina de *FLC*, como se ha visto en mutantes *yaf9a* (Zacharaki et al., 2012).

Por su parte, la proteína SWC6 que interacciona con algunas subunidades del FRI-C, también lo hace con SDG8/EFS, una metiltransferasa de H3K36, que participa junto con el PAF1-C en la activación transcripcional de *FLC* (Ko et al., 2010), estableciendo una posible conexión entre el complejo SWR1 y el complejo PAF1. Estudios con dobles mutantes *arp6 fri* y *sdg8 fri* demuestran la existencia de un mayor efecto en la reducción del enriquecimiento de la RNA polimerasa II en el primer exón de *FLC*, comparado con los mutantes sencillos (Choi et al., 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto que las mutaciones *swc6* y *sdg8/efs* presentan un efecto aditivo sobre el fenotipo de floración temprana (Fig. 21), independientemente del fotoperiodo, sugiriendo la participación autónoma de SWC6 sobre el reclutamiento de la RNA polimerasa II y sobre la regulación de *FLC*, además de participar conjuntamente con FRI-C en la regulación de dicho locus. Aunque ningún componente del PAF1-C se encuentra físicamente conectado con FRI, este complejo se activa a través de otras proteínas como SDG8/EFS, que le permiten situarse en las regiones que rodean el inicio de la transcripción y reclutar a toda la maquinaria necesaria para la expresión de *FLC* (Choi et al., 2011). De esta manera PAF1-C interacciona con la RNA polimerasa II y orquesta el reclutamiento de múltiples modificadores de la cromatina, como histonas chaperonas, las metiltransferasas de histonas ATX1 y ATXR7 y los complejos H2BUb1 y COMPASS, para el inicio de la transcripción de *FLC* (Farrona et al., 2008; Berr et al., 2011). Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación, se ha demostrado que en plantas que contienen un alelo de *FRI* funcional, se produce un aumento del enriquecimiento de la proteína ARP6 en las regiones promotoras de *FLC*, lo que demuestra que el FRI-C es responsable del reclutamiento del SWR1-C en la cromatina de este gen (Choi et al., 2011). Estas observaciones genéticas y bioquímicas, junto con nuestros análisis genéticos (Fig. 21), indican la cooperación existente entre SWC6 y SDG8/EFS en la regulación de la expresión de *FLC*, a través del reclutamiento del PAF1-C y FRI-C, controlando de forma directa la transición floral (Choi et al., 2011).

Por tanto, la proteína SWC6 se une físicamente a ESD1/ARP6, YAF9A y SWC4, proteínas pertenecientes al SWR1-C y probablemente al NuA4-C, introduciendo marcas epigenéticas como la acetilación de H4 y H2A, que estimulan el intercambio de H2A.Z. Por su parte, SWC6 es reclutada por el FRI-C a través de las subunidades FLX y SUF4,

y es capaz de interaccionar con SDG8/EFS que activa al PAF1-C, complejo responsable de reunir a la maquinaria de transcripción necesaria para activar la expresión de *FLC* (Lázaro et al., 2008; Choi et al., 2011). Estos resultados sugieren que YAF9A y SWC6 juegan un importante papel en la coordinación de diferentes complejos como SWR1-C, FRI-C y de factores generales relacionados con la transcripción, como SDG8/EFS y TAF14, en la región promotora de *FLC* regulando su expresión (Choi et al., 2011). Sin embargo, SWR1-C, FRI-C y SDG8/EFS presentan una función parcialmente independiente en el reclutamiento de RNA pol II sobre el promotor de *FLC*. Estos recientes hallazgos nos dan idea de la complicada secuencia de eventos que requiere la transcripción génica en eucariotas y la relación existente entre la incorporación de H2A.Z en determinadas regiones del genoma, con la activación de la expresión de genes diana como *FLC* (Choi et al., 2011).

Otra de las características de la regulación epigenética de *FLC* es su implicación en el desarrollo embrionario. Diferentes reguladores específicos que mantienen elevados los niveles de expresión de *FLC* en *Arabidopsis* durante la fase vegetativa, también juegan un importante papel en la reactivación de este locus durante la embriogénesis (Yun et al., 2011). De hecho, mutaciones en subunidades del complejo PAF1, que confieren alteraciones en la reactivación de la expresión de *FLC*, también dan lugar a defectos en la formación de semillas. Igualmente, los mutantes *esd1/arp6* o *atx1* y *atx2* presentan defectos en las semillas, aunque estos son menos severos que los observados en mutantes del FRI-C y PAF1-C (Yun et al., 2011). Esto indica que los componentes del FRI-C y PAF1-C presentan un papel crítico en la reactivación de la expresión de *FLC* durante la embriogénesis, y los defectos causados por esta deficiencia, se mantienen hasta la maduración de la semilla. Ya que los complejos PAF1 y FRI funcionan igualmente en procesos relacionados con la transcripción y la modificación de histonas en la cromatina de *FLC*, es posible que ambos complejos participen conjuntamente en la reactivación de *FLC* durante la embriogénesis. A partir de las conexiones establecidas entre estos complejos y algunos componentes del SWR1-C, y de su implicación en la activación de *FLC*, se podría interpretar la dificultad que muestran algunos mutantes del complejo SWR1 como *swc4*, *arp4* y *tip49as* para desarrollar semillas completas (He et al., 2004; Oh et al., 2004; Yun et al., 2011).

Otra de las subunidades del SWR1-C que interacciona con FRI-C de *Arabidopsis* es el homólogo de RVB1 (Choi et al., 2011). En levaduras, la subunidad Rvb1 presenta una función helicasa y se encuentra compartida con INO80-C (Morrison y Shen, 2009). En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la interrupción del locus *RVB1* impide la

viabilidad de la planta y que el silenciamiento de su expresión (*tip49as*) también conlleva alteraciones fenotípicas similares a las presentadas por las plantas *swc4i* (Holt et al., 2002). Adicionalmente, se ha demostrado la interacción física de AtRVB1 con determinados genes de respuesta a daños producidos por patógenos, como RPM1 y RPP5, de manera que el silenciamiento de *RVB1* revela un aumento en la expresión de estos genes de resistencia a enfermedades, sugiriendo que *RVB1* podría estar actuando como un regulador negativo de la función de algunos genes de resistencia a patógenos (Holt et al., 2002).

También los mutantes *pie1*, *swc6* y *hta9 hta11* presentan una respuesta constitutiva de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y alteraciones en la expresión de múltiples genes implicados en la respuesta de inmunidad innata (March-Díaz et al., 2008), lo que provoca una muerte celular espontánea y la activación de la respuesta de resistencia a patógenos, sin estar presentes dichos patógenos, lo que se denomina una respuesta de hipersensibilidad (March-Díaz et al., 2008; March-Díaz y Reyes, 2009). Los mutantes *yaf9a yaf9b* al igual que plantas *tip49as* o *hta9 hta11*, presentan un aumento de la expresión de algunos de los genes que participan en la defensa frente a patógenos (Holt et al., 2002; March-Díaz et al., 2008). Además, en este trabajo hemos demostrado que en plantas donde la expresión de *SWC4* se encuentra silenciada, se observan evidencias de muerte celular acelerada en las hojas de roseta, que presentan síntomas de senescencia prematura (Fig. 31-32). Estas alteraciones fenotípicas de plantas *yaf9a yaf9b* y *swc4i*, que sugieren una respuesta de hipersensibilidad, son corroboradas por la reducción de la concentración de clorofilas presente en estas plantas (Fig. 34 y 57), alteraciones fisiológicas que son a menudo exhibidas por plantas infectadas por patógenos (Lim y Nam, 2005; Ascencio-Ibañez et al., 2008). Por tanto el SWR1-C podría estar reprimiendo la expresión de diferentes genes de defensa, de manera que mutaciones aisladas para algunos componentes de este complejo provocarían una reacción de hipersensibilidad en la planta, desarrollando síntomas de muerte celular y senescencia acelerada. Estos datos sugieren que tanto H2A.Z como el SWR1-C son requeridos para el mantenimiento de un estado reprimido de la respuesta SAR (March-Díaz y Reyes, 2009).

Los múltiples trabajos realizados durante los últimos años han descrito cómo la incorporación de H2A.Z en determinadas localizaciones de la cromatina, responde a los cambios originados en el entorno de la planta. Apoyando estas observaciones, los mutantes *esd1/arp6* presentan alteraciones en la respuesta a cambios en la temperatura ambiental y al ayuno de fosfato (Pi) (Kumar y Wigge, 2010; Smith et al., 2010). Por esta

razón, se ha propuesto la presencia o ausencia de H2A.Z en la cromatina de determinados loci, como base del mecanismo que media la respuesta a los cambios de temperatura ambiental (Franklin, 2010; Kumar y Wigge, 2010). La eliminación de H2A.Z del DNA durante la activación génica, también ocurre de la misma manera en levaduras y en humanos (Santisteban et al., 2000; Farris et al., 2005; Zhang et al., 2005), por lo que se ha propuesto que esta variante histónica podría favorecer la transcripción génica al facilitar la remodelación o la liberación de los nucleosomas de las zonas promotoras (Guillemettey Gaudreau, 2006). Estos datos, sumados a los resultados obtenidos Coleman-Derr y Zilberman (2012) corroboran una activación genética sensible a determinados estímulos donde las variaciones de los niveles de metilación en las regiones codificantes del gen permiten o no la incorporación de H2A.Z, modificando la estructura de la cromatina y el perfil de expresión génica en la planta (Coleman-Derr y Zilberman, 2012).

El mantenimiento de la integridad del genoma es esencial para la supervivencia de la célula. Así, la inestabilidad genómica es una marca común de algunos procesos de cáncer en humanos (Negrini et al., 2010). Estudios en humanos han demostrado una relación del enriquecimiento de Ach2A.Z en los nucleosomas localizados alrededor del sitio de iniciación de la transcripción, tanto de genes activos como en las regiones promotoras de genes que se van a activar (Valdés-Mora et al., 2011). Además, la desregulación genética originada en procesos cancerígenos se ha relacionado estrechamente con la distribución de Ach2A.Z y H2A.Z. Por su parte, existe una relación inversa entre la acetilación de H2A.Z, la trimetilación de H3K27 y la metilación del DNA en los promotores de aquellos genes transcripcionalmente activos (Valdés-Mora et al., 2011). Por tanto, la acetilación de H2A.Z podría suponer una modificación clave asociada a la activación de genes, en células normales y a una desregulación epigenética ocurrida en procesos tumorales (Valdés-Mora et al., 2011).

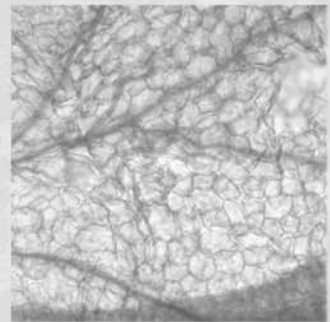
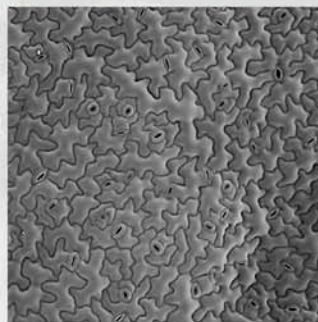
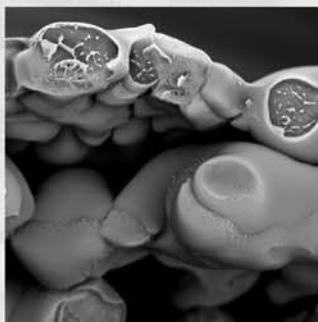
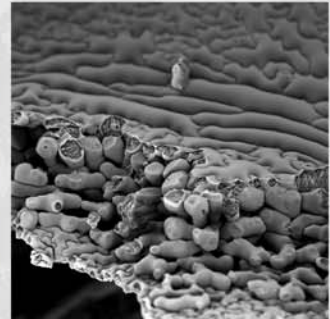
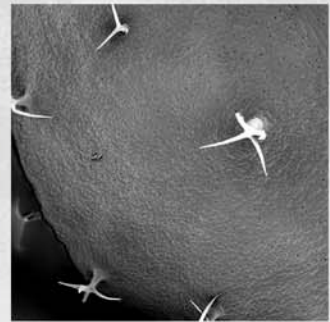
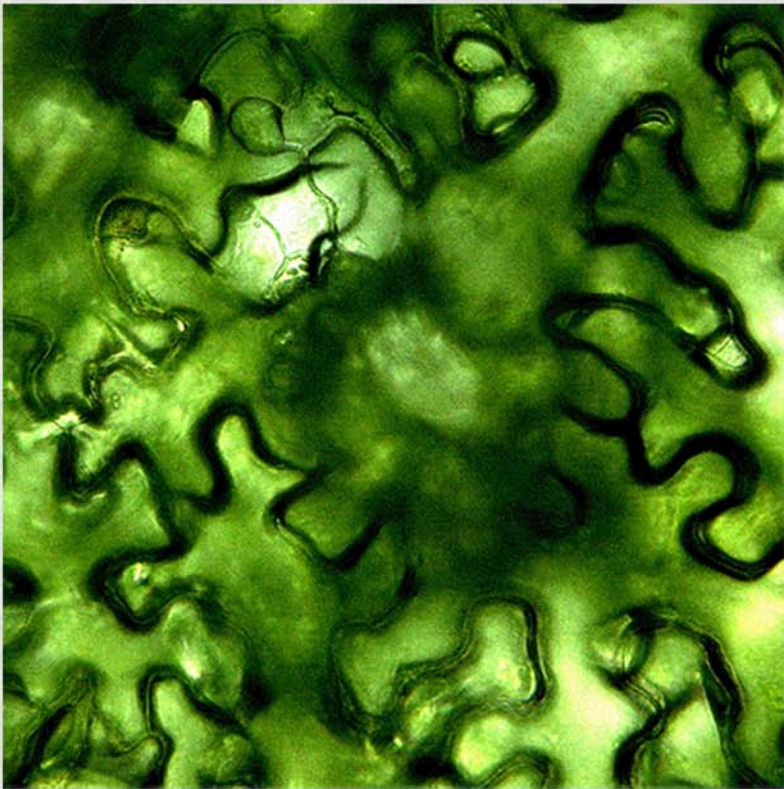
Como se ha podido determinar en los últimos años, el papel fundamental que desempeña la variante H2A.Z en la regulación de la transcripción, desde levaduras hasta humanos, depende de los niveles de metilación del DNA, de la disposición de otras marcas epigenéticas y del contexto de la cromatina en el cual se localizan estas marcas, en uno o dos nucleosomas en las zonas promotoras, o en numerosos nucleosomas contiguos en las zonas teloméricas silenciadas (Guillemettey Gaudreau, 2006). La presencia de H2A.Z está relacionada con el control de la expresión de ciertos genes, pero, además, también participa en la progresión del ciclo celular, la estabilidad del genoma, la supresión de RNAs antisentido, la adaptación a altas temperaturas, la

respuesta de la planta al ayuno de fosfato y al estrés biótico (Ahmad et al., 2010; Kumar y Wigge, 2010; Smith et al., 2010).

Todos los datos obtenidos en este trabajo, sugieren la existencia en *Arabidopsis* de los complejos de remodelación de cromatina SWR1 y NuA4, que catalizan el intercambio de la histona H2A por la variante histónica H2A.Z y la acetilación de histonas, respectivamente. También se ha demostrado una interacción entre las subunidades SWC6, SWC4 y YAF9A, que podrían estar formando parte de dichos complejos. El hipotético complejo SWR1 parece estar implicado en la regulación de diversos procesos como la transición floral, el desarrollo de los órganos florales y la morfología y tamaño de la hoja (Choi et al., 2005, 2007; Deal et al., 2005; Martin-Trillo et al., 2006; March-Díaz et al., 2007; Lázaro et al., 2008) y es responsable de la represión de la expresión de ciertos genes de respuesta a estrés biótico y abiótico, como los genes de resistencia a enfermedades y genes inducidos por choque térmico. Estos datos corroboran el efecto de H2A.Z sobre la expresión génica dependiente de los estímulos percibidos por la planta (March-Díaz et al., 2008; Kumar y Wigge, 2010; Coleman-Derr y Zilberman, 2012). Los defectos pleiotrópicos observados en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en alguna de la subunidades de los complejos SWR1 y NuA4, indican que los mecanismos de remodelación de la cromatina mediados por estos complejos afectan a una gran variedad de procesos del desarrollo necesarios para el normal funcionamiento de las plantas. De esta manera, los complejos SWR1 y NuA4 podrían trabajar de forma coordinada, permitiendo una fina regulación de la expresión génica para responder a las condiciones medioambientales variables que se producen en el entorno de la planta.



# CONCLUSIONES





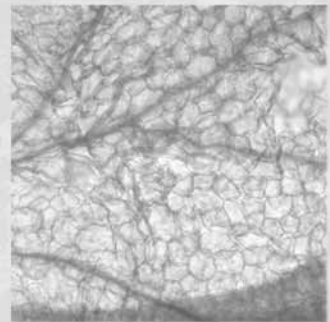
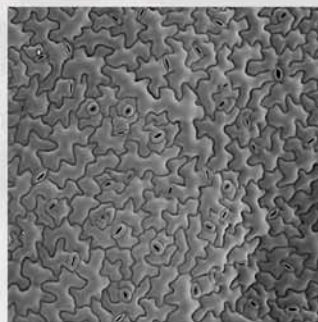
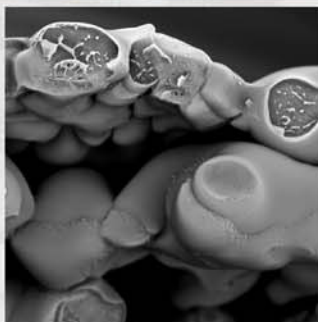
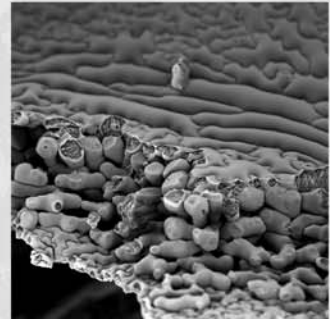
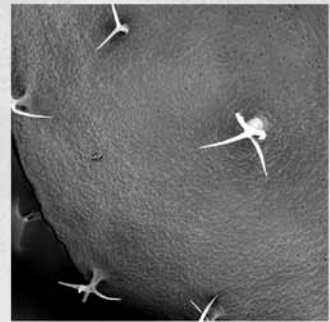
En el presente trabajo hemos abordado la caracterización genética y molecular de los loci *SWC6*, *SWC4*, *YAF9A* y *YAF9B* para establecer su papel en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*, y su participación en los distintos complejos remodeladores de cromatina que se encuentran implicados en la represión floral entre otros procesos del desarrollo de las plantas.

1. La expresión de los genes *SWC6*, *SWC4*, *YAF9A* y *YAF9B* muestra un patrón ubicuo, detectándose en todos órganos de la planta analizados. Siendo los niveles de expresión de *YAF9B* más bajos, en general, que los demás genes analizados.
2. El mutante *swc6* participa en la represión floral a través de la regulación de *FLC* y de otros genes *FLC-like*. *SWC6* se requieren para mantener los niveles de la acetilación de la histona H3 y la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 sobre la cromatina de *FLC*.
3. La mutación *swc6* interacciona de forma epistática con mutaciones en genes de la ruta autónoma y suprime parcialmente el fenotipo de floración tardío conferido por alelos activos de *FRI*.
4. El doble mutante *yaf9a yaf9b* presenta alteraciones del fenotipo más severas que las ocasionadas por la pérdida de función de uno de los genes. Esto indica la existencia de una redundancia funcional entre los genes *YAF9A* y *YAF9B*.
5. La pérdida de función del gen *SWC4* es letal, por lo que es esencial para la supervivencia de la planta al igual que su ortólogo en levaduras.
6. los mutantes de floración temprana *swc6* y *yaf9a yaf9b* presentan otras alteraciones del fenotipo, que afectan al desarrollo de los órganos florales y a la morfología y tamaño de la hoja, lo que sugiere la posible participación del complejo SWR1 en la regulación de esos procesos de desarrollo.
7. El silenciamiento de *SWC4* mediante RNAi, origina plantas con alteraciones fenotípicas similares a las del doble mutante *yaf9a yaf9b* pero no presentan alteración en el tiempo de floración.
8. *SWC6* interaccionan físicamente con *ESD1/ARP6*, *SWC4* y *YAF9A*, lo que sugiere que forman parte de un mismo complejo SWR1-C.





# BIBLIOGRAFÍA





## BIBLIOGRAFÍA

- Aasland R., A. Francis Stewart F. y Gibson T.J.** (1996). The SANT domain: A putative DNA binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends Biochem. Sci.* 21:87-88
- Achard P, Herr A, Baulcombe D. y Harberd N.** (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131:3357–3365.
- Achard P, Liao L, Jiang C, Desnos T, Bartlett J, Fu X, y Harberd N.** (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* 143:1163–1172.
- Adamczyk B.J., Lehti-Shiu M.D., y Fernandez D.E.** (2007). The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*, *Plant J.* 50 1007–1019.
- Adrian J., Farrona S., Reimer J.J., Albani M.C., Coupland G., y Turck F.** (2010). *cis*-Regulatory elements and chromatin state coordinately control temporal and spatial expression of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 1425-1440.
- Agger K., Christensen J., Cloos P.A. y Helin K.** (2008). The emerging functions of histone demethylases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 159–168.
- Ahmed S, Dul B, Qiu X, Walworth NC.** (2007). Msc1 Acts Through Histone H2A.Z to Promote Chromosome Stability in *Schizosaccharomyces pombe* *Genetics*. November; 177(3): 1487–1497. doi: 10.1534/genetics.107.078691.
- Alexander MP.** (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* 44 117–122.
- Alexandre CM y Hennig L.** (2008). FLC or not FLC: the other side of vernalization. *Journal of experimental botany.* 59(6):1127-35.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653-657.
- Altaf M., Auger A., Covic M., y Cote J.** (2009). Connection between histone H2A variants and chromatin remodeling complexes. *Biochemistry and cell biology* 87(1), 35-50.
- Altaf M., Auger A., Monnet-Saksouk J., Brodeur J., Piquet S., Cramet M., Bouchard N., Lacoste N., Utley R.T., Gaudreau L., y Côté J.** (2010). NuA4-dependent acetylation of nucleosomal histones H4 and H2A directly stimulates incorporation of H2A.Z by the SWR1 complex. *J. Biol. Chem.* 285, 15966–15977.
- Álvarez ME, Nota F, Cambiagno DA.** (2010). Epigenetic control of plant immunity. *Mol Plant Pathol.* Jul;11(4):563-76. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00621.x.
- Álvarez-Venegas R, Pien S, Sadler M, Witmer X, Grossniklaus U, Avramova Z.** (2003). ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr Biol.* 15;13(8):627-37.
- Álvarez-Venegas R, Avramova Z.** (2005). Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive *Arabidopsis* genes and in *atx1* mutants. *Nucleic Acids Res.* 33(16):5199-207.
- Alvey L y Harberd N.** (2005). DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs? *Physiol Plant* 123(2):153–160. doi:10.1111/j.1399-3054.2004.00412.x.
- Amasino R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J* 61, 1001-1013.
- Amasino R.M., y Michaels S.D.** (2010). The timing of flowering. *Plant Physiol* 154, 516-520.

**Andres F., y Coupland G.** (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* 13, 627–639.

**Angel A, Song J, Dean C, y Howard M.** (2011). A Polycomb-based switch underlying quantitative epigenetic memory. *Nature* 476:105–108.

**Ascencio-Ibáñez JA., Sozzani R., Lee T.J., Chu T.M., Wolfinger R.D., Cella R. y Hanley-Bowdoin L.** (2008). Global Analysis of Arabidopsis Gene Expression Uncovers a Complex Array of Changes Impacting Pathogen Response and Cell Cycle during Geminivirus Infection. *Plant Physiology*, Vol. 148, pp. 436–454.

**Assaad F.F., Signer E.R.** (1990). Cauliflower mosaic virus P35S promoter activity in *Escherichia coli*. *MOL GEN GENET* , vol. 223, no. 3, pp. 517-520.DOI: 10.1007/BF00264462.

**Auger A., Galarneau L., Altaf M., Nourani A., Doyon Y., Utley R.T., Cronier D., Allard S., y Cote, J.** (2008). Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol Cell Biol* 28, 2257-2270.

**Aukerman M.J., Hirschfeld M., Wester L., Weaver M., Clack T., Amasino R.M., y Sharrock R.A.** (1997). A deletion in the *PHYD* gene of the Arabidopsis Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/farred light sensing. *Plant Cell* 9, 1317-1326.

**Aukerman M.J. y Sakai H.** (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell.* 15(11), 2730-2741.

**Ausín I., Alonso-Blanco C., Jarillo J.A., Ruiz-García L. y Martínez-Zapater J.M.** (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nat Genet.* 36(2), 162-166.

**Ausín I., Alonso-Blanco C. y Martínez-Zapater J.M.** (2005). Environmental regulation of flowering. *Int J Dev Biol.* 49(5-6), 689-705.

**Autran D., Baroux C., Raissig M.T., Lenormand T., Wittig M., Grob S., Steimer A., Barann M., Klostermeier U.C., Leblanc O., Vielle-Calzada J.P., Rosenstiel P., Grimanelli D., y Grossniklaus U.** (2011). Maternal Epigenetic Pathways Control Parental Contributions to Arabidopsis Early Embryogenesis. *Cell* 145, 707–719.

**Avvakumov N, Nourani A, Côté J.** (2011). Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell.* Mar 4;41(5):502-14. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.013.

**Babiarz J.E., Halley J.E. y Rine J.** (2006). Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 20, 700–710.

**Badis, G., Berger, M.F., Philippakis, A.A. et al.** (2009) Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science*, 324, 1720–1723.

**Balasubramanian S, y Weigel D.** (2006). Temperature Induced Flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav.* 1(5):227-8.

**Balasubramanian S., Sureshkumar S., Agrawal M., Michael T.P., Wessinger C., Maloof J.N., Clark R., Warthmann N., Chory J. y Weigel D.** (2006a). The *PHYTOCHROME C* photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 38(6), 711-5.

**Balasubramanian S., Sureshkumar S., Lempe J. y Weigel D.** (2006b). Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.* 2(7):e106.

**Barrero J.M., González-Bayón R., del Pozo J.C., Ponce M.R. y Micol J.L.** (2007). *INCURVATA2* encodes the catalytic subunit of DNA Polymerase alpha and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19(9), 2822-2838.



- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, et al.** (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823–837.
- Bastow R., Mylne J.S., Lister C., Lippman Z., Martienssen R.A. y Dean C.** (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 427, 164–167.
- Baurle I. y Dean C.** (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125, 655–664.
- Baurle I. y Dean C.** (2008) Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of Arabidopsis targets. *PLoS ONE* 3, e2733.
- Beemster, G.T., Vercruyse, S., De Veylder, L., Kuiper, M., y Inzé, D.** (2006). The Arabidopsis leaf as a model system for investigating the role of cell cycle regulation in organ growth. *J. Plant Res.* **119**: 43–50.
- Benhamed M., Bertrand C., Servet C., y Zhou DX.** (2006). Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression, *Plant Cell* 18 2893–2903.
- Berger, M.F., Philippakis, A.A., Qureshi, A.M., He, F.S., Estep, P.W. 3rd y Bulyk, M.L.** (2006) Compact, universal DNA microarrays to comprehensively determine transcription-factor binding site specificities. *Nat. Biotechnol.* 24, 1429–1435.
- Bernatzky R, Tanksley SD.** (1986). Majority of random cDNA clones correspond to single loci in the tomato genome. *Mol & Gen Genet.*;203:8–14.
- Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., y Lejeune P.** (1993). Physiological Signals That Induce Flowering. *The Plant Cell*, Vol. 5, 1147-1 155.
- Bernier G, Périlleux C.** (2005). A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnol J.* 3(1):3-16.
- Berr A., Xu L., Gao J., Cognat V., Steinmetz A., Dong A. y Shen WH.** (2009). SET DOMAIN GROUP25 encodes a histone methyltransferase and is involved in *FLOWERING LOCUS C* activation and repression of flowering. *Plant Physiol.* 151(3), 1476–1485.
- Berr A., Shafiq S., y Shen W.H.** (2011). Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochim Biophys Acta* 1809: 567–576.
- Billon P. y Côté J.** (2012). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochimica Biophysica Acta* Vol 1819, Issues 3–4, 290–302.
- Blázquez M.A., Soowal L.N., Lee I., y Weigel D.** (1997). *LEAFY* expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* 124, 3835–3844.
- Blázquez M.A., Green R., Nilsson O., Sussman M.R., y Weigel D.** (1998). Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* 10, 791–800.
- Blázquez M.A. y Weigel D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404(6780), 889–92.
- Blázquez M.A., Ahn J.H., y Weigel D.** (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* 33, 168–171.
- Bonasio R., Tu S., y Reinberg D.** (2010). Molecular signals of epigenetic states. *Science* 330 612–616.
- Bork P, Holm L, Sander C** (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* 242:309–320.

**Boudreault A. A., Cronier D., Selleck W., Lacoste N., Utley R. T., Allard S., Savard J., Lane W. S., Tan S., y Côté, J.** (2003). Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes & development* 17(11), 1415-1428.

**Bouveret R., Schönrock N., Grissem W. y Hennig L.** (2006). Regulation of flowering time by Arabidopsis MSI1. *Development*. 133(9), 1693-1702.doi:10.1242/dev.02340.

**Bowman JL., Alvarez J., Weigel D., Meyerowitz EM. y Smyth DR.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *Apetala 1* and interacting genes. *Development*. 119, 721-743.

**Boyer LA., Latek RR. y Peterson CL.** (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 158–163.

**Bratzel F, Lopez-Torreon G, Koch M, Del Pozo JC, Calonje M.** (2010). Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr Biol* , 20:1853-1859.

**Brickner DG, Cajigas I, Fondufe-Mittendorf Y, Ahmed S, Lee PC, Widom J, et al.** (2007). H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* 2007; 5:81.

**Cai, Y., Jin, J., Florens, L., Swanson, S.K., Kusch, T., Li, B., Workman, J.L., Washburn, M.P., Conaway, R.C. y Conaway, J.W.** (2005) The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J. Biol. Chem.* 280, 13665–13670.

**Calonje M., Sanchez R., Chen L. y Sung ZR.** (2008). EMBRYONIC FLOWER1 Participates in Polycomb Group-Mediated AG Gene Silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 277-291.

**Cao Y., Dai Y., Cui S. y Ma L.** (2008). Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of *FLOWERING LOCUS C* regulates flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell*. 20(10), 2586-2602.

**Cartagena JA, Matsunaga S, Seki M, Kurihara D, Yokoyama M, Shinozaki K, Fujimoto S, Azumi Y, Uchiyama S, Fukui K.** (2008). The Arabidopsis SDG4 contributes to the regulation of pollen tube growth by methylation of histone H3 lysines 4 and 36 in mature pollen. *Dev Biol* 315 355–368.

**Castellano, M.M., del Pozo, J.C., Ramirez-Parra, E., Brown, S., y Gutierrez, C.** (2001). Expression and stability of Arabidopsis CDC6 are associated with endoreplication. *Plant Cell* 13: 2671-2686.

**Castillejo C. y Pelaz S.** (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Curr Biol*. 18, 1338-1343.

**Causier B., Schwarz-Sommer Z., Davies B.** (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs Seminars in Cell & Developmental Biology 21 73–79. doi:10.1016/j.semcdb.2009.10.005.

**Cazzonelli Cl., Cuttriss A.J., Cossetto S.B., Pye W., Crisp P., Whelan J., Finnegan E.J., Turnbull C, Pogson B.J.** (2009). Regulation of carotenoid composition and shoot branching in Arabidopsis by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell* 21 39–53.

**Chan SK. y Struhl G.** (1997). Sequence-specific RNA binding by Bicoid. *Nature* 388, 634.

**Chan S.W.** (2008) Inputs and outputs for chromatin-targeted RNAi. *Trends Plant Sci.* 13, 383–389.

**Chandler J. y Dean C.** (1994). Factors influencing the vernalization response and flowering time of late flowering mutants of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *J. Exp. Bot.* 45, 1279–1288.

**Chaubet N., Flenet M., Clement B., Brignon P. y Gigot C.** (1996). Identification of cis-elements regulating the expression of an Arabidopsis histone H4 gene. *Plant J.* 10, 425–435.

- Chen M., y Ni M.** (2006). RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates CONSTANS expression and photoperiodic flowering, *Plant J.* 46; 823–833.
- Chen H., Huang X., Gusmaroli G., Terzaghi W., Lau O.S., Yanagawa Y., Zhang Y., Li J., Lee J.H., Zhu D., y Deng X.W.** (2010). Arabidopsis CULLIN4-Damaged DNA Binding Protein 1 Interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA Complexes to Regulate Photomorphogenesis and Flowering Time. *Plant Cell.* 22, 108-123.
- Chiang GC, Barua D, Kramer EM, Amasino RM, y Donohue K.** (2009). Major flowering time gene, FLOWERING LOCUS C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 11661–11666.
- Choi K., Kim S., Kim S.Y., Kim M., Hyun Y., Lee H., Choe S., Kim S.G., Michaels S. y Lee I.** (2005). SUPPRESSOR OF FRIGIDA3 encodes a nuclear ACTIN-RELATED PROTEIN6 required for floral repression in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 2647-2660.
- Choi K., Park C., Lee J., Oh M., Noh B. y Lee I.** (2007). Arabidopsis homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* 134, 1931-1941.
- Choi J., Hyun Y., Kang M.J., In Yun H., Yun J.Y., Lister C., Dean C., Amasino R.M., Noh B., Noh Y.S., y Choi Y.** (2009). Resetting and regulation of FLOWERING LOCUS C expression during Arabidopsis reproductive development. *Plant J.* 57: 918–931.
- Choi K., Kim J., Hwang H.J., Kim S., Park C., Kim S.Y., y Lee I.** (2011). The FRIGIDA Complex Activates Transcription of *FLC*, a Strong Flowering Repressor in Arabidopsis, by Recruiting Chromatin Modification Factors. *Plant Cell* 23, 289-303.
- Chuck G., Cigan AM., Saeteurn K. y Hake S.** (2007). The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nat Genet.* 39(4), 544-549.
- Clapier CR, y Cairns BR.** (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:273-304. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
- Clarkson M.J., Wells J.R., Gibson F., Saint R., y Tremethick D.J.** (1999). Regions of variant histone His2AvD required for Drosophila development. *Nature* 399, 694-697.
- Coen E.S., y Meyerowitz E.M.** (1991). The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353, 31-37.
- Coleman-Derr D, y Zilberman D.** (2012). Deposition of Histone Variant H2A.Z within Gene Bodies Regulates Responsive Genes. *PLoS Genet* 8(10): e1002988.
- Conerly ML, Teves SS, Diolaiti D, Ulrich M, Eisenman RN, y Henikoff S.** (2010). Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis. *Genome Res* 20: 1383–1390.
- Corbesier L, y Coupland G.** (2006). The quest for florigen: a review of recent progress. *J Exp Bot*;57(13):3395-403.
- Costas C., de la Paz Sanchez M., Stroud H. et al.** (2011). Genome-wide mapping of Arabidopsis thaliana origins of DNA replication and their associated epigenetic marks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 395–400.
- Crevillen P., y Dean C.** (2011). Regulation of the floral repressor gene *FLC*: the complexity of transcription in a chromatin context. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 38-44.
- Crevillen P., Sonmez C., Wu Z., y Dean C.** (2012). A gene loop containing the floral repressor *FLC* is disrupted in the early phase of vernalization. *The EMBO Journal* 00, 1–9.

**D'Aloia M, Bonhomme D, Bouché F, Tamseddak K, Ormenese S, Torti S, Coupland G, Périlleux C.** (2011). Cytokinin promotes flowering of Arabidopsis via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *Plant J. Mar*;65(6):972-9. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04482.x.

**De Lucas M, Daviere JM, Rodriguez-Falcon M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, Fankhauser C, Blazquez MA, Titarenko E, y Prat S.** (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451(7177): 480–484. doi:10.1038/nature06520.

**De Lucia F., Crevillen P., Jones A.M., Greb T., y Dean C.** (2008). A PHDpolycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16831-16836.

**De Montaigu A., Toth R., y Coupland G.** (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends Genet* 26, 296-306.

**Del Olmo I., López-González L., Martín-Trillo MM., Martínez-Zapater JM., Piñeiro M. y Jarillo JA.** (2010). *EARLY IN SHORT DAYS 7 (ESD7)* encodes the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon and is required for flowering repression through a mechanism involving epigenetic gene silencing. *Plant J.* 61(4), 623-636.

**Deal RB., Kandasamy MK., McKinney EC. y Meagher RB.** (2005). The nuclear actin-related protein ARP6 is a pleiotropic developmental regulator required for the maintenance of *FLOWERING LOCUS C* expression and repression of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell.* 17(10), 2633-2646.

**Deal RB, Topp CN., McKinney EC. y Meagher RB.** (2007). Repression of flowering in Arabidopsis requires activation of *FLOWERING LOCUS C* expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell.* 19(1), 74-83.

**Deal RB, y Henikoff S.** (2010). Total number of starsA simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue. *Dev Cell.* 18(6):1030-40.

**Deleris A., Greenberg M.V.C., Ausin I., Law R.W.Y., Moissiard G., Schubert D., Jacobsen S.E.** (2010). Involvement of a Jumonji-C domain-containing histone demethylase in DRM2-mediated maintenance of DNA methylation, *EMBO Rep.* 11 950–955.

**Deleris A, Stroud H, Bernatavichute Y, Johnson E, Klein G, Schubert D, Jacobsen SE.** (2012). Loss of the DNA methyltransferase MET1 Induces H3K9 hypermethylation at PcG target genes and redistribution of H3K27 trimethylation to transposons in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* 2012 Nov;8(11):e1003062. doi: 10.1371/journal.pgen.1003062.

**Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Chua, N.H., and Gutierrez, C.** (2006). Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol.* **140**: 67-80.

**Dhillon N., Oki M., Szyjka S.J., Aparicio O.M., y Kamakaka R.T.** (2006). H2A.Z functions to regulate progression through the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 26(2): 489–501. doi:10.1128/MCB. 26.2.489-501.2006. PMID:16382141.

**Diaz-Trivino, S., Castellano, M.M., Sanchez, M.P., Ramirez-Parra, E.,Desvoyes, B., y Gutierrez, C.** (2005). The genes encoding ArabidopsisORC subunits are E2F targets and the two ORC1 genes are differently expressed in proliferating and endoreplicating cells. *NucleicAcids Res.* 33: 5404-5414.

**Doerks, T., Copley, R. R., Schultz, J., Ponting, C. P., and Bork, P.** (2002). Systematic identification of novel protein domain families associated with nuclear functions. *Genome Res.* 12, 47–56.

**Dong, X.** (2004) NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 547–552.

**Dong C.H., Agarwal M., Zhang Y., Xie Q. y Zhu, J.K.** (2006). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8281-8286.

- Dorca-Fornell C., Gregis V., Grandi V., Coupland G., Colombo L., Kater MM.** (2011). The Arabidopsis SOC1-like genes AGL42, AGL71 and AGL72 promote flowering in the shoot apical and axillary meristems. *Plant J*; 67(6):1006-17. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04653.x.
- Doyon Y., y Côté J.** (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Current opinion in genetics & development* 14(2), 147-154.
- Doyon Y., Selleck W., Lane WS., Tan S. y Côté J.** (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol.* 24(5), 1884-1896.
- Draker R., y Cheung P.** (2009). Transcriptional and epigenetic functions of histone variant H2A.Z. *Biochem Cell Biol.* 87, 19-25.
- Durant M., and Pugh B. F.** (2007). NuA4-Directed Chromatin Transactions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Molecular and cellular biology* 27(15), 5327-5335.
- El-Din El-Assal S., Alonso-Blanco C., Peeters A.J., Raz V., y Koornneef M.** (2001). A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of *CRY2*. *Nat Genet* 29, 435-440.
- Elmayan T., Proux F. y Vaucheret H.** (2005). *Arabidopsis* RPA2: A Genetic Link among Transcriptional Gene Silencing, DNA Repair, and DNA Replication. *Current Biology* 15, 1919-1925.
- Eriksson S., Böhlenius H., Moritz T. y Nilsson O.** (2006). GA4 is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *Plant Cell* 18, 2172-2181.
- Faast R., Thonglairoam V., Schulz TC., Beall J., Wells JR., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, PD., Tremethick, DJ., y Lyons, I.** (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr Biol* 11, 1183-1187.
- Farris, S.D., Rubio, E.D., Moon, J.J., Gombert, W.M., Nelson, B.H., y Krumm, A.** (2005). Transcription-induced chromatin remodeling at the *c-myc* gene involves the local exchange of histone H2A.Z. *J Biol Chem*, 280(26): 25298-25303. doi:10.1074.
- Farrona S., Hurtado L., Bowman JL. y Reyes JC.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* SNF2 homolog AtBRM controls shoot development and flowering. *Development.* 131(20), 4965-4975.
- Farrona S., Coupland G. y Turck F.** (2008). The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin. Cell Dev Biol.* 19(6), 560-573.
- Farrona S, Hurtado L, March-Díaz R, Schmitz RJ, Florencio FJ, et al.** (2011) .Brahma Is Required for Proper Expression of the Floral Repressor FLC in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 6(3): e17997. doi:10.1371/journal.pone.0017997.
- Feinberg AP. y Vogelstein B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1), 6-13.
- Feng S. H., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J. L., Wang F., Chen L. Y., Yu L., Iglesias-Pedraz J. M., Kircher S. et al.** (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451, 475-479.
- Ferrando A., Koncz-Kalman Z., Farras R., Tiburcio A., Schell J., y Koncz C.** (2001). Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells. *Nucleic Acids Res* 29, 3685-3693.
- Finnegan, E.J., y Dennis, E.S.** (2007). Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at *FLC* is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr Biol* 17, 1978-1983.

**Fleury D, Himanen K, Cnops G, Nelissen H, Boccardi TM, Maere S, Beemster GT, Neyt P, Anami S, Robles P, Micol JL, Inzé D, Van Lijsebettens M.** (2007). The *Arabidopsis thaliana* homolog of yeast BRE1 has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth. *Plant Cell* 19: 417–432.

**Fornara F., y Coupland G.** (2009). Plant phase transitions make a SPLash. *Cell* 138, 625-627.

**Fornara F., Panigrahi K.C., Gissot L., Sauerbrunn N., Ruhl M., Jariillo J.A., y Coupland G.** (2009). *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev Cell* 17, 75-86.

**Fornara F., de Montaigu A. y Coupland G.** (2010). SnapShot: Control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell*. 141, 550e1-550e3.

**Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I.** (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 1;32(Web Server issue):W273-9.

**Fu X, y Harberd NP.** (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421(6924):740–743. doi:10.1038/nature01387.

**Fujiyama K., Tanaka R., Terashima M. y Seki T.** (2002). N-linked glycan structures of glycoproteins in suspension cultured *Arabidopsis thaliana* MM2d cells. *Plant Biotech.* 24, 255-259.

**Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A. A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Stillman, D. J., and Cote, J.** (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol. Cell* 5,927–937.

**Galvão VC, Horrer D, Küttner F, Schmid M.** (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 139(21):4072-82. doi: 10.1242/dev.080879.

**Gazzani S., Gendall A.R., Lister C., y Dean C.** (2003). Analysis of the molecular basis of flowering time variation in *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol* 132, 1107-1114.

**Gendall A.R., Levy Y.Y., Wilson A., y Dean C.** (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107, 525-535.

**Geraldo N., Baurle I., Kidou S.I., Hu X., y Dean C.** (2009). FRIGIDA delays flowering in *Arabidopsis* via a co-transcriptional mechanism involving direct interaction with the nuclear cap binding complex. *Plant Physiol* 150, 1611-1618.

**Germann S, Juul-Jensen T, Letarnec B, Gaudin V.** (2006). DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling in vivo, and its use to identify putative LHP1 target loci. *Plant J* 48: 153–163.

**Gevry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L.** (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* 21: 1869–1881.

**Giakountis A. y Coupland G.** (2008). Phloem transport of flowering signals. *Curr Opin Plant Biol.* 11(6), 687-694.

**Gocal G, Sheldon C, Gubler F, Moritz T, Bagnall D, MacMillan C, Li S, Parish R, Dennis E, Weigel D, King R.** (2001). GAMYBlike genes, flowering, and gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127:1682–1693.

**Godoy M, Franco-Zorrilla JM, Pérez-Pérez J, Oliveros JC, Lorenzo O, Solano R.** (2011). Improved protein-binding microarrays for the identification of DNA-binding specificities of transcription factors. *Plant J.* 66(4):700-11. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04519.x

- Gómez-Mena C., Piñeiro M., Franco-Zorrilla J.M., Salinas J., Coupland G., y Martínez-Zapater J.M.** (2001). Early bolting in short days: An *Arabidopsis* mutation that causes early flowering and partially suppresses the floral phenotype of leafy. *Plant Cell* 13, 1011–1024.
- Goto N., Kumagai T. y Koornneef M.** (1991). Flowering responses to lightbreaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiol. Plant.* 83, 209-215.
- Grandi V, Gregis V, Kater MM.** (2012). Uncovering genetic and molecular interactions among floral meristem identity genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* Mar;69(5):881-93. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04840.x.
- Greaves, I.K., Rangasamy, D., Ridgway, P . y Tremethick, D.J.** (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 525–530.
- Greb T., Mylne J.S., Crevillen P., Geraldo N., An H., Gendall A.R., y Dean C.** (2007). The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis FLC*. *Curr Biol* 17, 73-78.
- Greenberg, J.T. y Yao, N.** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 6, 201–211.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z, Powers S, Gong F, Phillips A, Hedden P, Sun T, Thomas S.** (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3399–3414.
- Grove, C.A., De Masi, F., Barrasa, M.I., Newburger, D.E., Alkema, M.J., Bulyk, M.L. y Walhout, A.J.** (2009) A multiparameter network reveals extensive divergence between *C. elegans* bHLH transcription factors. *Cell*, 138, 314–327.
- Gu, X., Jiang, D., Wang, Y., Bachmair, A., y He, Y.** (2009). Repression of the floral transition via histone H2B monoubiquitination. *Plant J.* 57: 522–533.
- Gu X, Jiang D, Yang W, Jacob Y, Michaels SD, He Y.** (2011). *Arabidopsis* homologs of retinoblastoma-associated protein 46/48 associate with a histone deacetylase to act redundantly in chromatin silencing. *PLoS Genet.* 7(11):e1002366. doi: 10.1371/journal.pgen.1002366.
- Guillemette B, Gaudreau L.** (2006). Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem Cell Biol.*;84(4):528-35.
- Gutierrez C.** (2005). Coupling cell proliferation and development in plants. *Nat. Cell Biol.* 7, 535–541.
- Gutierrez C.** (2009). The *Arabidopsis* Cell Division Cycle. *The Arabidopsis Book.* 10.1199/tab.0120.
- Harberd NP, Belfield E, y Yasumura Y.** (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21(5):1328–1339. doi: 10.1105/tpc.109.066969.
- Hardy S, Jacques PE, Gevry N, Forest A, Fortin ME, et al.** (2009) The euchromatic and heterochromatic landscapes are shaped by antagonizing effects of transcription on H2A.Z deposition. *PLoS Genet* 5: e1000687. doi:10.1371/ journal.pgen.1000687.
- He Y., Michaels SD. y Amasino, RM.** (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* 302, 1751-1754.
- He Y., Doyle MR. y Amasino RM.** (2004). PAF1-complex-mediated histone methylation of *FLOWERING LOCUS C* chromatin is required for the vernalization-responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18, 2774-2784.

- He Y. y Amasino RM.** (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends Plant Sci.* 10, 30–35.
- He Y.** (2009). Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Mol Plant.* 2(4), 554-564.
- He Y.** (2012). Chromatin regulation of flowering. *Trends Plant Sci.* (9):556-62.
- Helliwell C, Wood C, Robertson M, Peacock WJ, y Dennis E.** (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecularweight protein complex. *Plant J* 46:183–192.
- Heo J.B., y Sung S.** (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331, 76-79.
- Hill K., Wang H., y Perry S.E.** (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *Plant J.* 53 172–185.
- Hiraoka K, Yamaguchi A, Abe M, Araki T.** (2012). The Florigen Genes FT and TSF Modulate Lateral Shoot Outgrowth in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* doi: 10.1093/pcp/pcs168.
- Hisamatsu T. y King RW.** (2008). The nature of floral signals in Arabidopsis. II. Roles for *FLOWERING LOCUS T (FT)* and gibberellin. *J Exp Bot.* 59(14), 3821-3829.
- Höfgen R. y Willmitzer L.** (1988). Storage of competent cells for Agrobacterium transformation *Nucleic Acids Res.* 16(20): 9877
- Holm L, Sander C.** (1995). Dali: A network tool for protein structure comparison. *Trends Biochem Sci* 20:478–480.
- Holt B.F., Boyes D.C. Ellerstrom M., Siefers N., Wiig A., Kauffman S., Grant M.R. y Dangl J.L.** (2002). An evolutionarily conserved mediator of plant disease resistance gene function is required for normal Arabidopsis development. *Dev. Cell.* 2, 807–817.
- Hoppmann V., Thorstensen T., Kristiansen P.E., Veiseth S.V., Rahman M.A., Finne K., Aalen R.B., y Aasland R.** (2011). The CW domain, a new histone recognition module in chromatin proteins, *EMBO J.* 18 1939–1952.
- Hornyik C. Terzi LC, y Simpson GG.** (2010). The Spen family protein FPA controls alternative cleavage and polyadenylation of RNA. *Dev. Cell* 18, 203–213.
- Hou C., Dale R., Dean A.** (2010). Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:3651–3656. doi: 10.1073/pnas.0912087107.
- Hua S, Kallen CB, Dhar R, Baquero MT, Mason CE, Russell BA, Shah PK, Liu J, Khramtsov A, Tretiakova MS, et al.** (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Mol Syst Biol* 4: 188. doi: 10.1038/msb.2008.25.
- Ietswaart R., Wu Z. y Dean C.** (2012). Flowering time control: another window to the connection between antisense RNA and chromatin. *Trends Genet* 28: 445–453.
- Imaizumi T., Schultz TF., Harmon FG., Ho LA. y Kay SA.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science.* 309(5732), 293-297.
- Imaizumi T.** (2010). Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Curr Opin Plant Biol* 13, 83-89.
- Immink RG, Posé D, Ferrario S, Ott F, Kaufmann K, Valentim FL, de Folter S, van der Wal F, van Dijk AD, Schmid M, y Angenent GC.** (2012). Characterization of SOC1's central role in flowering by the



identification of its upstream and downstream regulators. *Plant Physiol.* 160(1):433-49. doi: 10.1104/pp.112.202614.

**Inagaki S., Miura-Kamio A., Nakamura Y., Lu F., Cui X., Cao X., Kimura H., Saze H., Kakutani T.** (2010). Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome, *EMBO J.* 29 3496–3506.

**Inze D., y Veylder L.D.** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40, 77–105.

**Ishitani M., Xiong L., Lee H., Stevenson B. y Zhu J.K.** (1998). HOS1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1151-1161.

**Ito S., Song Y.H., y Imaizumi T.** (2012a) LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis, *Mol. Plant* 5 573–582.

**Ito S., Song Y.H., Josephson-Day AR., Miller R.J., Breton G., Olmstead RG, Imaizumi T.** (2012b). FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 109(9): 3582–3587. doi: 10.1073/pnas.1118876109

**Jackson JD, y Gorovsky MA.** (2000). Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic Acids Res* 28:3811–3816.

**Jackson SD.** (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytol.* 181(3), 517-531.

**Jaeger K.E., Graf A., y Wigge P.A.** (2006). The control of flowering in time and space. *J Exp Bot* 57, 3415-3418.

**Jang S., Marchal V., Panigrahi KC., Wenkel S., Soppe W., Deng XW., Valverde F. y Coupland G.** (2008). Arabidopsis COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J.* 27(8), 1277-1288.

**Jang S, Torti S, y Coupland G.** (2009). Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in Arabidopsis. *Plant J.* 60(4):614-25. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03986.x.

**Jarillo J.A., Del Olmo I., Gómez-Zambrano A., Lázaro A., López-González L., Miguel E., Narro-Diego L., Sáez D., y Piñero M.** (2008). Photoperiodic control of flowering time. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6, 221-244.

**Jarillo JA., Piñero M., Cubas P., Martínez-Zapater JM.** (2009). Chromatin remodeling in plant development. *Int J Dev Biol.* *Dev Biol* 53, 1581-1596.

**Jarillo JA., y Piñero M.** (2011). Timing is everything in plant development. The central role of floral repressors, *Plant Sci.* 181. 364–378.

**Jeong JH., Song HR., Ko JH., Jeong YM., Kwon YE., Seol JH., Amasino RM., Noh B. y Noh YS** (2009). Repression of *FLOWERING LOCUS T* chromatin by functionally redundant histone H3 lysine 4 demethylases in Arabidopsis. *Plos One.* 4(11), e8033.

**Jiang CZ, Gu X, Peterson T.** (2004). Identification of conserved gene structures and carboxy-terminal motifs in the Myb gene family of Arabidopsis and *Oryza sativa* L. ssp. indica. *Genome Biol* 5: R46.

**Jiang D., Yang W., He Y. y Amasino RM.** (2007). Arabidopsis relatives of the human lysine-specific Demethylase1 repress the expression of *FWA* and *FLOWERING LOCUS C* and thus promote the floral transition. *Plant Cell* 19(10), 2975-2987.

**Jiang D., Wang Y., Wang Y. y He Y.** (2008). Repression of *FLOWERING LOCUS C* and *FLOWERING LOCUS T* by the Arabidopsis Polycomb Repressive Complex 2 Components. *PLoS ONE.* 3(10), e3404.

**Jiang D., Gu X. y He Y.** (2009). Establishment of the winter-annual growth habit via FRIGIDA-mediated histone methylation at *FLOWERING LOCUS C* in Arabidopsis. *Plant Cell*. 21(6), 1733-1746.

**Jiang D., Kong N.C., Gu X., Li Z., He Y.** (2011). Arabidopsis COMPASS-Like complexes mediate histone H3 lysine-4 trimethylation to control floral transition and plant development, *PLoS Genet*. 7 (2011) e1001330.

**Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W.** (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet*. 8: 217–230.

**Jin J.B., y Hasegawa P.M.** (2008). Flowering time regulation by the SUMO E3 ligase SIZ1. *Plant Signal Behav* 3, 891-892.

**Jin JB, Jin YH, Lee J, Miura K, Yoo CY, Kim WY, Van Oosten M, Hyun Y, Somers DE, Lee I, Yun DJ, Bressan RA, Hasegawa PM.** (2008). The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure. *Plant J*. 53(3):530-40.

**Johanson U., West J., Lister C., Michaels S., Amasino R., y Dean C.** (2000). Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* 290, 344-347.

**Jung, J.H., Seo, Y.H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.H., y Park, C.M.** (2007). The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 2736-2748.

**Jung J. H., Ju Y., Seo P. J., Lee J. H. y Park C. M.** (2011). The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in Arabidopsis. *Plant J*. 69, 577-588.

**Jurado, S., Diaz-Trivino, S., Abraham, Z., Manzano, C., Gutierrez, C., y del Pozo, C.** (2008). SKP2A, an F-box protein that regulates cell division, is degraded via the ubiquitin pathway. *Plant J*. 53: 828-841.

**Kabani M., Michot K., Boschiero C. y Werner M.** (2005). Anc1 interacts with the catalytic subunits of the general transcription factors TFIID and TFIIF, the chromatin remodeling complexes RSC and INO80, and the histone acetyltransferase complex NuA3. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 332: 398–403.

**Kakutani T, Munakata K, Richards EJ, Hirochika H.** (1999). Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of Arabidopsis thaliana. *Genetics*. Feb;151(2):831-8.

**Kandasamy M.K., Deal R.B., McKinney E.C. y Meagher R.B.** (2005a). Silencing the nuclear actin-related protein *AtARP4* in Arabidopsis has multiple effects on plant development, including early flowering and delayed floral senescence. *Plant J*. 41, 845-858.

**Kandasamy MK, McKinney EC, Deal RB, Meagher RB.** (2005b). Arabidopsis ARP7 Is an Essential Actin-Related Protein Required for Normal Embryogenesis, Plant Architecture and Floral Organ Abscission. *Plant Physiol*. 138(4):2019-32.

**Kapoor A., Agarwal M., Andreucci A., Zheng X., Gong Z., Hasegawa P.M., Bressan R.A. y Zhu J.K.** (2005a). Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA-methylation independent manner in Arabidopsis. *Curr. Biol*. 15(21), 1912-1918.

**Kapoor A., Agius F. y Zhu J.K.** (2005b). Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS. Lett*. 579(26), 5889-5898.

**Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S., y Fukui, K.** (2005). Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol. Biol*. 58: 1-13.

**Keogh M. C., Mennella T. A., Sawa C., Berthelet S., Krogan N. J., Wolek A., Podolny V., Carpenter L. R., Greenblatt J. F., Baetz K., y Buratowski S.**(2006) The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes & development* 20(6), 660-665.

- Kim HJ., Hyun Y., Park JY., Park MJ., Park MK., Kim MD., Kim HJ., Lee MH., Moon J., Lee I. y Kim J.** (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through *FVE* in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet.* 36, 167-171.
- Kim SY., He Y., Jacob Y., Noh YS., Michaels S. y Amasino R.** (2005). Establishment of the vernalization responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis* requires a putative histone H3 methyl transferase. *Plant Cell* 17, 3301-3310.
- Kim S., Choi K., Park C., Hwang H.J., y Lee I.** (2006a). SUPPRESSOR OF FRIGIDA4, encoding a C2H2-Type zinc finger protein, represses flowering by transcriptional activation of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell* 18: 2985–2998.
- Kim S, Soltis PS, Wall K, Soltis DE** (2006b) Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Mol Biol Evol* 23(1):107–120. doi:10.1093/molbev/msj014
- Kim DH., Doyle MR., Sung S. y Amasino RM.** (2009a). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25, 277-299.
- Kim, M.J., Lee, T.H., Pahk, Y.M., Kim, Y.H., Park, H.M., Choi, Y.D., Nahm, B.H. and Yeon-Ki Kim, Y.K.** (2009b) Quadruple 9-mer-based protein binding microarray with DsRed fusion protein. *BMC Mol. Biol.* 10, 91–102.
- Kim DH, y Sung S:** (2010).The Plant Homeo Domain finger protein, VIN3- LIKE 2, is necessary for photoperiod-mediated epigenetic regulation of the floral repressor, MAF5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:17029-17034.
- Kim SY., Zhu T. y Sung ZR.** (2010). Epigenetic regulation of gene programs by *EMF1* and *EMF2* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152(2), 516-528.
- Kim DH., y Sung S.** (2012). Environmentally coordinated epigenetic silencing of FLC by protein and long noncoding RNA components. *Curr Opin Plant Biol.* 15(1):1-6. doi: 10.1016/j.pbi.2011.10.004.
- King RW, Moritz T, Evans LT, Junttila O, Herlt AJ.** (2001). Long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. *Plant Physiol* 127(2):624–632.
- King, G., Chanson, A. H., McCallum, E. J., Ohme-Takagi, M., Byriel, K., Hill, J. M., Martin, J. L., Mylne, J. S.** (2012). The *Arabidopsis* B3 domain protein VERNALIZATION1 is involved in processes essential for development with structural and mutational studies revealing its DNA binding surface. *J Biol Chem.* 1;288(5):3198-207. doi: 10.1074/jbc.M112.438572.
- Knight H., Thomson A.J., McWatters H.G.** (2008). Sensitive to freezing 6 integrates cellular and environmental inputs to the plant circadian clock, *Plant Physiol.* 148 293–303.
- Ko JH., Mitina I., Tamada Y., Hyun Y., Choi Y., Amasino RM., Noh B. y Noh YS.** (2010). Growth habit determination by the balance of histone methylation activities in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 29(18), 3208-3215.
- Kobor M.S., Venkatasubrahmanyam S., Meneghini MD., Gin JW., Jennings JL., Link AJ., Madhani HD. y Rine J.** (2004). A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* 2, 0587-0599.
- Kondorosi E, Roudier F, Gendreau E.** (2000). Plant cell-size control: growing by ploidy? *Curr Opin Plant Biol* 3: 488–492.
- Koornneef M., Hanhart CJ. y Van Der Veen JH.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.* 229, 57–66.

**Kotake T, Takada S, Nakahigashi K, Ohto M, Goto K** (2003) Arabidopsis TERMINAL FLOWER 2 gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both FLOWERING LOCUS T to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiol* 44: 555–564.

**Krogan NJ, Kim M, Ahn SH, Zhong G, Kobor MS, Cagney G, Emili A, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt JF.** (2002). RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol.*;22(20):6979-92.

**Krogan NJ., Dover J., Wood A., Schneider J., Heidt J., Boateng MA., Dean K., Ryan OW., Golshani A. y Johnston M.** (2003a). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: Linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* 11, 721–729.

**Krogan NJ., Keogh MC., Datta N., Sawa C., Ryan OW., Ding H., Haw RA., Pootoolal J., Tong A., Canadien V., Richards DP., Wu X., Emili A., Hughes TR., Buratowski S. y Greenblatt JF.** (2003b). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell.* (6), 1565-1576.

**Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Emili A, Boone C, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt J.**(2003c). Methylation of histone H3 by Set2 of *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol.* Jun;23(12):4207-18.

**Krogan N. J., Baetz K., Keogh M. C., Datta N., Sawa C., Kwok, T. C., Thompson N. J., Davey M. G., Pootoolal J., Hughes T. R., Emili A., Buratowski S., Hieter P., y Greenblatt J. F.** (2004). Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(37), 13513-13518.

**Kumar SV. y Wigge PA.** (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. *Cell.* 140(1), 136-147.

**Kumar SV., Lucyshyn D., Jaeger KE., Alo´s E., Alvey E., Harberd NP. y Wigge PA.** (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*; Vol 000,1; doi:10.1038/nature10928.

**Kurihara, D., Matsunaga, S., Kawabe, A., Fujimoto, S., Noda, M., Uchiyama, S., y Fukui, K.** (2006). Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* 48: 572-580.

**Kusch T., Florens L., Macdonald W. H., Swanson S. K., Glaser R. L., Yates J.R., 3rd, Abmayr S. M., Washburn M. P., y Workman J. L.** (2004) Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*: 306 (5704), 2084-2087.

**Kwon CS, Wagner D.** (2007). Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. *Trends Genet.* 23(8):403-12.

**Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R. and Tjian, R.** (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol. Cell* 11, 365-376.

**Lafarge S, Montane MH** (2003) Characterization of the Arabidopsis thaliana ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: AtBRCA1, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Res* 31: 1148–1155.

**Lammens, T., Boudolf, V., Kheibarshekan, L., Zalmas, L.P., Gaamouche, T., Maes, S., Vanstraelen, M., Kondorosi, E., La Thangue, N.B., Govaerts, W., Inzé, D., y De Veylder, L.** (2008). Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 14721-14726.

**Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y.** (2001). Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *J Exp Bot.* 52: 183–192.

- Lauber, M.H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer U., Hwang, I., Lukowitz, W. y Jurgens, G.** (1997) The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol.* 139, 1485–1493.
- Lauria M, y Rossi V.** (2011). Epigenetic control of gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta.* 1809(8):369-78. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.03.002.
- Lázaro A., Gómez-Zambrano A., López-González L., Piñeiro M. y Jarillo JA.** (2008). Mutations in the Arabidopsis SWC6 gene, encoding a component of the SWR1 chromatin remodelling complex, accelerate flowering time and alter leaf and flower development. *J Exp Bot.* 59(3), 653-666.
- Lázaro A., Valverde F., Piñeiro M., Jarillo J.A.** (2012). The Arabidopsis E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates CONSTANS abundance in the photoperiodic control of flowering. *Plant Cell* 24 982–999.
- Le Masson I., Yu D.Y., Jensen K., Chevalier A., Courbeyrette R., Boulard Y., Smith M.M., Mann C.** (2003). Yaf9, a novel NuA4 histone acetyltransferase subunit, is required for the cellular response to spindle stress in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 23 6086–6102.
- Lee I., Aukerman M.J., Gore S.L., Lohman K.N., Michaels S.D., Weaver L.M., John M.C., Feldmann K.A., y Amasino R.M.** (1994). Isolation of *LUMINIDEPENDENS*: a gene involved in the control of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell* 6, 75-83.
- Lee H, Suh SS, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim SG, Lee JS, Kwon YM, Lee I.** (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. *Genes Dev* 14: 2366–2376.
- Lee H., Xiong L., Gong Z., Ishitani M., Stevenson B. y Zhu J.K.** (2001). The Arabidopsis *HOS1* gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleocytoplasmic partitioning. *Gen Dev.* 15, 912-924.
- Lee J.H., Yoo S.J., Park S.H., Hwang I., Lee J.S., y Ahn J.H.** (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes Dev* 21, 397-402.
- Lee J., Oh M., Park H. y Lee I.** (2008). SOC1 translocated to nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J.* 55(5), 832-843.
- Lee, G. E., J. H. Kim, M. Taylor, y Muller M. T.** (2010a). DNA methyltransferase 1 associate protein (DMAP1) is a co-repressor that stimulates DNA methylation globally and locally at sites of double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 285:37630–37640.
- Lee JS, Smith E, Shilatifard A.** (2010b). The language of histone crosstalk. *Cell.* 142(5):682-5. doi: 10.1016/j.cell.2010.08.011.
- Lee J. y Lee I.** (2010). Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *J Exp Bot.* 61(9), 2247-2254.
- Lee, J.H., Park, S.H. y Ahn, J.H.** (2012a). Functional conservation and diversification between rice OsMADS22/OsMADS55 and Arabidopsis SVP proteins. *Plant Sci* 185- 186: 97-104.
- Lee JH., Kim JJ., Kim SH., Cho HJ., Kim J., y Ahn JH.** (2012b) The E3 ubiquitin ligase HOS1 Regulates Low Ambient Temperature-Responsive Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 53(10):1802-14. doi: 10.1093/pcp/pcs123.
- Levy Y.Y., Mesnage S., Mylne J.S., Gendall A.R., y Dean C.** (2002). Multiple roles of Arabidopsis *VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science* 297, 243-246.
- Li B., Carey M. y Workman JL.** (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128, 707-719.

**Li D., Liu C., Shen L., Wu Y., Chen H., Robertson M., Helliwell C.A., Ito T., Meyerowitz E., y Yu H.** (2008a). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev Cell* **15**, 110-120.

**Li F., Huarte M., Zaratiegui M., Vaughn MW., Shi Y., Martienssen R. y Cande WZ.** (2008b). Lid2 is required for coordinating H3K4 and H3K9 methylation of heterochromatin and euchromatin. *Cell*. **135**(2), 272-283.

**Libault M, Tessadori F, Germann S, Snijder B, Fransz P, et al.** (2005) The Arabidopsis LHP1 protein is a component of euchromatin. *Planta* **222**: 910–925.

**Light WH, Brickner DG, Brand VR, y Brickner JH** (2010) Interaction of a DNA zip code with the nuclear pore complex promotes H2A.Z incorporation and INO1 transcriptional memory. *Mol Cell* **40**: 112–125.

**Lim MH., Kim J., Kim YS., Chung KS., Seo YH., Lee I., Kim J., Hong CB., Kim HJ. y Park CM.** (2004). A new Arabidopsis gene, *FLK*, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via *FLOWERING LOCUS C*. *Plant Cell*. **16**(3), 731-740.

**Lim PO. y Nam HG.** (2005). The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in Arabidopsis. *Curr Top Dev Biol* **67**: 49–83.

**Lin YY, Lu JY, Zhang J, Walter W, Dang W, Wan J, Tao SC, Qian J, Zhao Y, Boeke JD, Berger SL, Zhu H.** (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell*. **20**;136(6):1073-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.033.

**Liu C, Zhou J, Bracha-Drori K, Yalovsky S, Ito T, y Yu H.** (2007a). Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development* **134**, 1901–1910.

**Liu F, Quesada V, Crevillen P, Bäurle I, Swiezewski S, y Dean C.** (2007b). The Arabidopsis RNA-binding protein FCA requires a lysinespecific demethylase 1 homolog to downregulate. *FLC Mol Cell* **28**: 398–407.

**Liu C., Chen H., Er H.L., Soo H.M., Kumar P.P., Han J.H., Liou Y.C., y Yu H.** (2008a). Direct interaction of *AGL24* and *SOC1* integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development* **135**, 1481-1491.

**Liu H., Yu X., Li K., Klejnot J., Yang H., Lisiero D., y Lin C.** (2008b). Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis. *Science* **322**, 1535-1539.

**Liu C, Xi WY, Shen LS, Tan CP, y Yu H.** (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Development Cell* **16**, 711–722.

**Liu C., Lu F., Cui X., y Cao X.** (2010a). Histone methylation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61** 395–420.

**Liu F, Marquardt S, Lister C, Swiezewski S, y Dean C.** (2010b). Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers Arabidopsis FLC chromatin silencing. *Science*; **327**(5961):94-7. doi: 10.1126/science.1180278.

**López-González L., Mouriz A., Narro-Diego L., Martínez-Zapater JM, Jarillo JA y Piñeiro M.** (2013). A regulatory mechanism involving plant specific PHD-containing proteins mediates chromatin-dependent repression of the floral integrator genes in Arabidopsis. (En revisión).

**Lorrain S., Vaillau F., Balague C. y Roby, D.** (2003). Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* **8**, 263–271.

**Lu F, Li G, Cui X, Liu C, Wang XJ, Cao X.** (2008). Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in Arabidopsis and rice. *Integr Plant Biol.* **50**(7):886-96. doi: 10.1111/j.1744-7909.2008.00692.x.

- Lu F., Cui X., Zhang S., Liu C., Cao X.** (2010). JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in *Arabidopsis*, *Cell Res.* 20 387–390.
- Lu F., Cui X., Zhang S., Jenuwein T., Cao X.** (2011). *Arabidopsis* REF6 is a histone H3 lysine 27 demethylase, *Nat. Genet.* 43 715–719.
- Luger K., Mäder AW., Richmond RK., Sargent DF. y Richmond TJ.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 389(6648), 251-260.
- Lukas, J., Lukas, C. y Bartek, J.** (2011). More than just a focus: the chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* 13, 1161–1169.
- Lukowitz, W., Mayer, U. y Jurgens, G.** (1996). Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell*, 84, 61–71.
- Macknight R., Bancroft I., Page T., Lister C., Schmidt R., Love K., Westphal L., Murphy G., Sherson S., Cobbett C. y Dean C.** (1997). *FCA*, a gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell.* 89(5), 737-745.
- Manzano D., Marquardt S., Jones A.M., Baurle I., Liu F., y Dean C.** (2009). Altered interactions within FY/AtCPSF complexes required for *Arabidopsis* FCA-mediated chromatin silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8772-8777.
- March-Díaz R., García-Domínguez M., Florencio F.J. y Reyes J.C.** (2007). SEF, a new protein required for flowering repression in *Arabidopsis*, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiol.* 143(2), 893-901.
- March-Díaz R., García-Domínguez M., Lozano-Juste J., Leon J., Florencio F.J., y Reyes J.C.** (2008). Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in *Arabidopsis*. *Plant J* 53, 475-487.
- March-Díaz R., y Reyes J.C.** (2009). The Beauty of Being a Variant H2AZ and the SWR complex in plants. *Molecular Plant* 2, 565-577.
- Marques M., Laflamme L., Gervais A.L., y Gaudreau L.** (2010). Reconciling the positive and negative roles of histone H2A.Z in gene transcription. *Epigenetics* 5, 267-272.
- Martín-Trillo M., Lázaro A., Poethig R. S., Gómez-Mena C., Piñeiro M., Martínez-Zapater J.M. y Jarillo J.A.** (2006). *EARLY IN SHORT DAYS 1* (*esd1*) encodes ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (*AtARP6*), a putative component of chromatin remodelling complexes that positively regulates FLC accumulation in *Arabidopsis*. *Development*, 133, 1241-1252.
- Martínez-Zapater, J.M., Coupland, G., Dean, C., y Koornneef, M.** (1994). The transition to flowering in *Arabidopsis*. *Arabidopsis* 403-433. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Matangkasombut, O., Buratowski, R. M., Swilling, N. W. and Buratowski, S.** (2000). Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.* 14, 951-962.
- Matangkasombut O., y Buratowski S.** (2003). Different sensitivities of Bromodomain Factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Molecular cell* 11(2), 353-363.
- Mathieu J., Yant L.J., Mürdter F., Küttner F. y Schmid M.** (2009). Repression of flowering by the miR172 target *SMZ*. *PLoS Biol.* 7(7), e1000148.
- Mathur J., Mathur N., Kernebeck B. y Hülskamp M.** (2003). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 1632-1645.

**Matsubara K, Ogiso-Tanaka E, Hori K, Ebana K, Ando T, Yano M.** (2012). Natural variation in Hd17, a homolog of Arabidopsis ELF3 that is involved in rice photoperiodic flowering. *Plant Cell Physiol.*53(4):709-16. doi: 10.1093/pcp/pcs028.

**Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, et al.** (2008) Nucleosome organization in the Drosophila genome. *Nature* 453: 358–362.

**Mayor C., Brudno M., Schwartz J. R., Poliakov A., Rubin E. M., Frazer K. A., Pachter L. S. and Dubchak I.** (2000) VISTA: Visualizing Global DNA Sequence Alignments of Arbitrary Length. *Bioinformatics*, 16:1046.

**Meagher RB, Kandasamy MK, Deal RB, McKinney EC.** (2007) Actin-related proteins in chromatin-level control of the cell cycle and developmental transitions. *Trends Cell Biol.*17:325–32.

**Medler S, Al Husini N, Raghunayakula S, Mukundan B, Aldea A, Ansari A.** (2011). Evidence for a complex of transcription factor IIB with poly(A) polymerase and cleavage factor 1 subunits required for gene looping. *J Biol Chem* 286: 33709–33718.

**Melaragno, J.E., Mehrotra, B., and Coleman, A.W.** (1993). Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of Arabidopsis. *Plant Cell* 5: 1661-1668.

**Melzer S, Lens F, Gennen J, Vanneste S, Rohde A, Beeckman T.** (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics* 40, 1489–1492.

**Menges M., de Jager SM, Gruijsem W. y Murray JAH.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant Journal* 41, 546–566.

**Mersereau, M., Pazour, G.J. y Das, A.** (1990). Efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens by electroporation. *Gene* 90, 149-151

**Michaels, S.D.** (2009). Flowering time regulation produces much fruit. *Curr Opin Plant Biol* 12, 75-80.

**Michaels SD. y Amasino RM.** (1999). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell.* 11, 949–956.

**Michaels S.D., y Amasino R.M.** (2001). Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* 13, 935-941.

**Michaels S.D., He Y., Scortecci K.C., y Amasino R.M.** (2003). Attenuation of *FLOWERING LOCUS C* activity as a mechanism for the evolution of summerannual flowering behavior in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10102-10107.

**Micialkiewicz A., y Chelstowska A.** (2008). The essential function of Swc4p—a protein shared by two chromatin-modifying complexes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*—resides within its N-terminal part. *Acta Biochim. Pol.* 55:603–612.

**Millar C.B., Xu F., Zhang K.L. y Grunstein M.** (2006). Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev.* 20: 711–722.

**Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghohama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ, y Hasegawa PM.** (2005). The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24;102(21):7760-5.

**Miura K., Jin J.B., y Hasegawa P.M.** (2007a). Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10, 495-502.



- Miura K., Jin J.B., Lee J., Yoo C.Y., Stirm V., Miura T., Ashworth, E.N., Bressan, R.A., Yun, D.J., y Hasegawa, P.M.** (2007b). SIZ1-Mediated Sumoylation of ICE1 Controls *CBF3/DREB1A* Expression and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 1403-1414.
- Miura A., Nakamura M., Inagaki S., Kobayashi A., Saze H., Kakutani T.** (2009). An Arabidopsis jmjC domain protein protects transcribed genes from DNA methylation at CHG sites. *EMBO J.* 28 1078–1086.
- Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W. H., Sen S. and Wu C.** (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* 303, 343-348.
- Mizukami Y. y Fischer R.L.** (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 942–947.
- Mohan KN, Ding F, Chaillet JR.** (2011). Distinct roles of DMAP1 in mouse development. *Mol Cell Biol.* 31(9):1861-9. doi: 10.1128/MCB.01390-10.
- Moon J., Suh S.S., Lee H., Choi K.R., Hong C.B., Paek N.C., Kim S.G. y Lee I.** (2003a). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 35(5), 613-623.
- Moon YH., Chen L., Pan RL., Chang HS., Zhu T., Maffeo DM., y Sung ZR.** (2003b) EMF genes maintain vegetative development by repressing the flower program in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 681–693.
- Moran R. y Porath D.** (1980). Chlorophyll determination in intact tissues using N, N-dimethylformamide. *Plant Physiol.* 65. 478-479.
- Morillo-Huesca M, Maya D, Muñoz-Centeno MC, Singh RK, Oreal V, Reddy GU, Liang D, Géli V, Gunjan A, Chávez S.** (2010) FACT prevents the accumulation of free histones evicted from transcribed chromatin and a subsequent cell cycle delay in G1. *PLoS Genet* 6(5):e1000964.
- Morris K., Thornber S., Codrai L., Richardson C., Craig A., Sadanandom A., Thomas B., y Jackson S.** (2010). *DAY NEUTRAL FLOWERING* represses *CONSTANS* to prevent Arabidopsis flowering early in short days. *Plant Cell* 22, 1118-1128.
- Morrison AJ. y Shen X.** (2009). Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Molecular cell Biology* Vol.10; 373.
- Mortusewicz O, Leonhardt H, Cardoso MC.** (2008). Spatiotemporal dynamics of regulatory protein recruitment at DNA damage sites. *J Cell Biochem* 104: 1562–1569.
- Mozgova I., Mokros P., Fajkus J.** (2010). Dysfunction of Chromatin Assembly Factor 1 Induces Shortening of Telomeres and Loss of 45S rDNA in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, Vol. 22: 2768–2780.
- Mukherjee, S., Berger, M.F., Jona, G., Wang, X.S., Muzzey, D., Snyder, M., Young, R.A. y Bulyk, M.L.** (2004) Rapid analysis of the DNA-binding specificities of transcription factors with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 36, 1331–1339.
- Murase K, Hirano Y, Sun T, Hakoshima T.** (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*. *Nature* 456:459–463.
- Murashige T., y Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15, 473-497.
- Mylne J.S., Barrett L., Tessadori F., Mesnage S., Johnson L., Bernatavichute, Y.V., Jacobsen, S.E., Fransz, P., y Dean, C.** (2006). LHP1, the Arabidopsis homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of *FLC*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5012-5017.

**Nakahigashi K, Jasencakova Z, Schubert I, Goto K** (2005) The Arabidopsis heterochromatin protein1 homolog (TERMINAL FLOWER2) silences genes within the euchromatic region but not genes positioned in heterochromatin. *Plant Cell Physiol* 46: 1747–1756.

**Negishi M, Chiba T, Saraya A, Miyagi S, Iwama A.** (2009). Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process *Genes Cells*. Nov;14(11):1347-57. doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01352.x

**Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD.** (2010). Genomic instability: an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 220–228.

**Niu L., Lu F., Pei Y., Liu C., Cao X.** (2007). Regulation of flowering time by the protein arginine methyltransferase AtPRMT10. *EMBO reports* 8, 1190–1195. doi:10.1038/sj.embor.7401111.

**Noh YS. y Amasino RM.** (2003). *PIE1*, an ISWI family gene, is required for *FLC* activation and floral repression in Arabidopsis. *Plant Cell*. 15, 1671-1682.

**Noh B., Lee SH., Kim HJ., Yi G., Shin EA., Lee M., Jung KJ., Doyle MR., Amasino RM. y Noh YS.** (2004). Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. *Plant Cell*. 16(10), 2601-2613.

**Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, King JJ, Imaizumi T, Schultz TF, Farré EM, Kay SA.** (2011). The ELF4–ELF3–LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475 398–402.

**Oh S., Zhang H., Ludwig P. y Van Nocker S.** (2004). A mechanism related to the yeast transcriptional regulator Paf1c is required for expression of the Arabidopsis *FLC/MAF* MADS box gene family. *Plant Cell*. 16, 2940-2953.

**Oliveros, J.C.** (2007). VENNY An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

**Osnato M, Castillejo C, Matías-Hernández L, Pelaz S.** (2012). TEMPRANILLO genes link photoperiod and gibberellin pathways to control flowering in Arabidopsis. *Nat Commun*. 1;3:808. doi: 10.1038/ncomms1810.

**Owen-Hughes T. y Bruno M.** (2004). Molecular biology. Breaking the silence. *Science*.16; 303(5656):324-5.

**Papamichos-Chronakis M., Watanabe S., Rando O.J., y Peterson C.L.** (2011). Global regulation of H2A.Z localization by the INO80 chromatin-remodeling enzyme is essential for genome integrity. *Cell* 144, 200–213.

**Park S., Oh S., Ek-Ramos J. y van Nocker S.** (2010). PLANT HOMOLOGOUS TO PARAFIBROMIN is a component of the PAF1 complex and assists in regulating expression of genes within H3K27ME3-enriched chromatin. *Plant Physiol*. 153(2), 821-831.

**Pastore JJ, Limpuangthip A, Yamaguchi N, Wu MF, Sang Y, Han SK, Malaspina L, Chavdaroff N, Yamaguchi A, Wagner D.** (2011). LATE MERISTEM IDENTITY2 acts together with LEAFY to activate APETALA1. *Development*. 138(15):3189-98. doi: 10.1242/dev.063073.

**Pei Y, Niu L, Lu F, Liu C, Zhai J, Kong X, Cao X** (2007) Mutations in the type II protein arginine methyltransferase AtPRMT5 result in pleiotropic developmental defects in Arabidopsis. *Plant Physiol* 144: 1913–1923.

**Perkins KJ, Lusic M, Mitar I, Giacca M, Proudfoot NJ** (2008). Transcription-dependent gene looping of the HIV-1 provirus is dictated by recognition of pre-mRNA processing signals. *Mol Cell* 29: 56–68.

**Pien S, Grossniklaus U.** (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochim Biophys Acta*;1769(5-6):375-82.

- Pien S, Fleury D, Mylne JS, Crevillen P, Inzé D, Avramova Z, Dean C, Grossniklaus U.** (2008). ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3 lysine 4 trimethylation. *Plant Cell* 20 580–588.
- Piñeiro M., Gómez-Mena C., Schaffer R., Martínez-Zapater JM. y Coupland G.** (2003). *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS* is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in Arabidopsis by repressing *FT*. *Plant Cell*. 15(7) 1552-1562.
- Piñeiro M. y Jarillo J.A.** (2013). Ubiquitination in the control of photoperiodic flowering. *Plant Science* 198 (2013) 98– 109.
- Poethig, R.S.** (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250,923-930.
- Poethig, R.S.** (2009). Small RNAs and developmental timing in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 374–378.
- Porri A., Torti S., Romera-Branchat M. y Coupland G.** (2012). Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of Arabidopsis under long photoperiods *Development* 139, 2198-2209.
- Pouteau S., Ferret V., Gaudin V., Lefebvre D., Sabar M., Zhao G. y Prunus F.** (2004). Extensive phenotypic variation in early flowering mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135, 201-211.
- Pouteau S, Ferret V, Lefebvre D.** (2006). Comparison of environmental and mutational variation in flowering time in Arabidopsis. *J Exp Bot.*;57(15):4099-109.
- Pouteau S, y Albertini C.** (2009). The significance of bolting and floral transitions as indicators of reproductive phase change in Arabidopsis. *J Exp Bot.*;60(12):3367-77. doi: 10.1093/jxb/erp173.
- Provar N., y Zhu T.** (2003). A Browser-based Functional Classification SuperViewer for Arabidopsis Genomics. *Currents in Computational Molecular Biology* 2003:271-272.
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R. y Coupland G.** (1995). The *CONSTANS* gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*. 80, 847–857.
- Putterill J., Laurie R. y Macknight R.** (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* 26, 363–373.
- Raisner R.M., Hartley P.D., Meneghini M.D., Bao M.Z., Liu C.L., Schreiber S.L., Rando O.J., y Madhani H.D.** (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' end of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*. 123(2): 233-248.
- Raisner R. M., y Madhani H. D.** (2006) Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Current opinion in genetics & development* 16(2), 119-124.
- Ramirez-Parra E, Desvoyes B, Gutierrez C.** (2005) Balance between cell division and differentiation during plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 467–477.
- Ramirez-Parra E. y Gutierrez C.** (2007). The many faces of chromatin assembly factor 1. *Trends Plant Sci.* 12(12), 570-576.
- Rando OJ.** (2007). Global patterns of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev.* 17(2), 94-99.
- Ratcliffe O.J., Nadzan G.C., Reuber T.L., y Riechmann J.L.** (2001). Regulation of flowering in Arabidopsis by an *FLC* homologue. *Plant Physiol* 126, 122-132.

- Ratcliffe OJ., Kumimoto RW., Wong BJ. y Riechmann JL.** (2003). Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERING gene family: *MAF2* prevents vernalization by short periods of cold. *Plant Cell*. 15, 1159–1169.
- Rate DN., Cuenca JV., Bowman GR., Guttman DS. y Greenberg JT.** (1999). The Gain-of-Function Arabidopsis *acd6* Mutant Reveals Novel Regulation and Function of the Salicylic Acid Signaling Pathway in Controlling Cell Death, Defenses, and Cell Growth. *The Plant Cell*, Vol. 11, 1695–1708.
- Reeves, P. H. and Coupland, G.** (2001). Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants. *Plant Physiol*. 126, 1085-1091.
- Reeves PH., Murtas G., Dash S. y Coupland G.** (2002). *Early in short days 4*, a mutation in Arabidopsis that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor *FLC*. *Development* 129, 5349-5361.
- Reyes, J.C.** (2006) Chromatin modifiers that control plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 21–27.
- Richter R., Behringer C., Muller I.K., Schwechheimer C.** (2010) The GATA-type transcription factors GNC and GNL/CGA1 repress gibberellin signaling downstream from DELLA proteins and PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS. *Genes Dev*. 24 2093–2104.
- Roudier F., Ahmed I., Berard C., Sarazin A., Mary-Huard T., Cortijo S., Bouyer D., Caillieux E., Duvernois-Berthet E., Al-Shikhley L., Giraut L., Despres B., Drevensek S., Barneche F., Derozier S., Brunaud V., Aubourg S., Schnittger A., Bowler C., Martin-Magniette M.-L., Robin S., Caboche M., Colot V.** (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis, *EMBO J*. 18; 1928–1938.
- Rountree, M. R., K. E. Bachman, y S. B. Baylin.** (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet*. 25:269–277.
- Rusche, L. N., A. L. Kirchmaier, y J. Rine.** (2003). The establishment, inheritance and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 72:481–516.
- Sadeghi L, Bonilla C, Stralfors A, Ekwall K, Svensson JP** (2011) Podbat: a novel genomic tool reveals Swr1-independent H2A.Z incorporation at gene coding sequences through epigenetic meta-analysis. *PLoS Comput Biol* 7: e1002163. doi:10.1371/journal.pcbi.1002163.
- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, et al.** (2006). TM4 microarray software suite. *Methods in Enzymology*;411:134-93.
- Saleh A., Alvarez-Venegas R., Yilmaz M., Le O., Hou G., Sadler M., Al-Abdallat A., Xia Y, Lu, I. Ladunga G., Avramova Z.** (2008). The highly similar Arabidopsis homologs of trithorax ATX1 and ATX2 encode proteins with divergent biochemical functions, *Plant Cell* 20 568–579.
- Sambrook J., Fritsch EF. y Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez M. y Gutierrez C.** (2009). Novel insights into the plant histone code: lessons from ORC1. *Epigenetics*. 4(4), 205-208.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z.R., and Calonje, M.** (2008). RAWUL: A new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics* 9, 308.
- Santisteban MS, Kalashnikova T, Smith MM** (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103: 411–422.
- Sawa M., Nusinow DA., Kay SA. y Imaizumi T.** (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science*. 318 (5848), 261-265.

- Sawa M, y Kay SA.** (2011). GIGANTEA directly activates Flowering Locus T in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 12;108(28):11698-703. doi: 10.1073/pnas.1106771108.
- Saze H., Shiraishi A., Miura A., Kakutani T.** (2008). Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in *Arabidopsis thaliana*, *Science* 319 462–465.
- Schmid M., Uhlenhaut N. H., Godard F., Demar M., Bressan R., Weigel D. and Lohmann J. U.** (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130, 6001-6012.
- Schmitz RJ, Amasino RM** (2007). Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochim Biophys Acta* 1769: 269–275.
- Schmitz RJ., Sung S., y Amasino RM.** (2008). Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of *FLC* in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 411-416.
- Schmitz RJ., Tamada Y., Doyle MR., Zhang X. y Amasino RM.** (2009). Histone H2B deubiquitination is required for transcriptional activation of *FLOWERING LOCUS C* and for proper control of flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149(2), 1196-1204.
- Schomburg FM., Patton DA., Meinke DW. y Amasino RM.** (2001). FPA, a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. *Plant Cell.* 13(6), 1427-1436.
- Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh TY, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K.** (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 132: 887–898.
- Schonrock N, Bouveret R, Leroy O, Borghi L, Kohler C, et al.** (2006) Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev* 20: 1667–1678.
- Schulze J.M., Wang A.Y., y Kobor M.S.** (2009). YEATS domain proteins: A diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochem. Cell Biol.* 87: 65–75.
- Schulze JM, Wang AY, Kobor MS.** (2010) Reading chromatin: insights from yeast into YEATS domain structure and function. *Epigenetics.* 1;5(7):573-7.
- Schwechheimer C, Willige BC.** (2009). Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* 12(1):57–62. doi:10.1016/j.pbi.2008.09.004.
- Scortecci, K., Michaels, S.D., y Amasino, R.M.** (2003). Genetic interactions between FLM and other flowering-time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 52, 915-922.
- Searle I., y Coupland G.** (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J* 23, 1217-1222.
- Searle I., He Y., Turck F., Vincent C., Fornara F., Krober S., Amasino R.A., y Coupland G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20, 898-912.
- Searle I.R., Pontes O., Melnyk C.W., Smith L.M., Baulcombe D.C.** (2010) JMJ14, a JmjC domain protein, is required for RNA silencing and cell-to-cell movement of an RNA silencing signal in *Arabidopsis*, *Genes Dev.* 24 986–991.
- Sheldon C.C., Rouse D.T., Finnegan E.J., Peacock W.J., y Dennis E.S.** (2000). The molecular basis of vernalization: the central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3753-3758.
- Sheldon C.C., Finnegan E.J., Dennis E.S., y Peacock W.J.** (2006). Quantitative effects of vernalization on *FLC* and *SOC1* expression. *Plant J* 45, 871-883.

**Sheldon C.C., Hills M.J., Lister C., Dean C., Dennis E.S. y Peacock,W.J.** (2008) Resetting of FLOWERING LOCUS C expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 2214–2219.

**Sheldon CC, Jean Finnegan E, James Peacock W, y Dennis ES.** (2009). Mechanisms of gene repression by vernalization in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 59, 488–498.

**Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A. y Wu, C.A.**(2000). Chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406,541–544.

**Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Sakamoto T, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Sazuka T, Ashikari M, Matsuoka M.** (2006). The rice SPINDLY gene functions as a negative regulator of gibberellin signaling by controlling the suppressive function of the DELLA protein, SLR1, and modulating brassinosteroid synthesis. *Plant J* 48(3):390–402. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02875.x.

**Shin JH, Kang HC, Park YY, Ha DH, Choi YH, Eum HY, Kang BG, Chae JH, Shin I, Lee JH, Kim CG.** (2010). Corepressor MMTR/DMAP1 is an intrinsic negative regulator of CAK kinase to regulate cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun.* 5;402(1):110-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.09.126.

**Shindo C., Aranzana M.J., Lister C., Baxter C., Nicholls C., Nordborg M., y Dean C.** (2005). Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138, 1163-1173.

**Silverstone A, Ciampaglio C, Sun T.** (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10:155–169.

**Simpson GG., Dijkwel PP., Quesada V., Henderson I. y Dean C.** (2003). FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition. *Cell.* 113(6), 777-787.

**Singh BN, Hampsey M** (2007). A transcription-independent role for TFIIIB in gene looping. *Mol Cell* 27: 806–816.

**Song Y.H., Ito S., Imaizumi T.** (2010). Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 594–603.

**Song J, Angel A, Howard M, Dean C** (2012) Vernalization:a coldinduced epigenetic switch. *J Cell Sci* 125: 3723–3731.

**Srikanth A. y Schmid M.** (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2013–37.

**Strasser B, Alvarez MJ, Califano A, Cerdan PD** (2009). A complementary role for ELF3 and TFL1 in the regulation of flowering time by ambient temperature. *Plant J*, 58:629-640.

**Suárez-López P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F. y Coupland G.** (2001). *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 10 (6832), 1116-1120.

**Sugimoto-Shirasu K, y Roberts K** (2003) “Big it up”: endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 6: 544–553

**Sun TP.** (2010). Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* 154(2):567–570. doi:10.1104/pp.110.161554.

**Sunada, R., Gorzer, I., Oma, Y., Yoshida, T., Suka, N., Wintersberger, U., y Harata, M.** (2005). The nuclear actin-related protein Act3p/Arp4p is involved in the dynamics of chromatin-modulating complexes. *Yeast* 22, 753–768.

- Sung S. y Amasino RM.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*. 427(6970), 159-164.
- Sung ZR., Chen LJ., Moon YH. y Lertpiriyapong K.** (2003). Mechanisms of floral repression in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 6, 29-35.
- Sung S., Schmitz R.J., y Amasino R.M.** (2006a). A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20, 3244-3248.
- Sung S., He Y., Eshoo T.W., Tamada Y., Johnson L., Nakahigashi K., Goto K., Jacobsen S.E., y Amasino R.M.** (2006b). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat Genet* 38, 706-710.
- Svetelis A., Gevry N., y Gaudreau L.** (2009). Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. *Biochem Cell Biol.* 87, 179-188.
- Swiezewski S., Liu, F., Magusin A., y Dean C.** (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* 462, 799-802.
- Szerlong, H., Hinata, K., Viswanathan, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B. R.** (2008). The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 469-476.
- Takada S, Goto K.** (2003). TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *The Plant Cell* 15, 2856-2865.
- Talbert PB y Henikoff S.** (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Apr;11(4):264-75. doi: 10.1038/nrm2861.
- Tamada Y., Yun JY., Woo SC, and Amasino RM.** (2009). *ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7* Is Required for Methylation of Lysine 4 of Histone H3 and for Transcriptional Activation of *FLOWERING LOCUS C*. *Plant Cell.* 21(10): 3257-3269. doi: 10.1105/tpc.109.070060.
- Telfer A., Bollman K. y Poethig SR.** (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 645-654.
- Thompson JD, Gibson TJ., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins DG.** (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*;25:4876-4882.
- Thorstensen T, Grini P, Mercy I, Alm V, Erdal S, Aasland R, Aalen R.** (2008). The *Arabidopsis* SET-domain protein ASHR3 is involved in stamen development and interacts with the bHLH transcription factor ABORTED MICROSPORES (AMS). *Plant Mol Biol* 66 47-59.
- Tiwari SB., Shen Y., Chang H-C., Hou Y., Harris A., Ma SF., McPartland M., Hymus GJ., Adam L. y Marion C.** (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the *FLOWERING LOCUS T* promoter via a unique cis-element. *New Phytologist* 187, 57-66.
- Torti S., Fornara F., Vincent C., Andrés F., Nordström K., Göbel U., Knoll D., Schoof H. y Coupland G.** (2012). Analysis of the *Arabidopsis* shoot meristem transcriptome during floral transition identifies distinct regulatory patterns and a leucine-rich repeat protein that promotes flowering. *Plant Cell* 24, 444-462.
- Traas, J., Hulskamp, M., Gendreau, E., and Hofte, H.** (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 498-503.

**Trotter, K. W., Fan, H. Y., Ivey, M. L., Kingston, R. E., and Archer, T. K.** (2008). The HSA domain of BRG1 mediates critical interactions required for glucocorticoid receptor-dependent transcriptional activation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1413–1426.

**Tsukada Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P. y Zhang, Y.** (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* 439, 811-816.

**Tsukaya H.** (2002). Leaf Development, *The Arabidopsis Book*. doi: e0072. 10.1199/tab.0072.

**Turck F., Roudier F., Farrona S., Martin-Magniette M.L., Guillaume E., Buisine N., Gagnot S., Martienssen R.A., Coupland G. y Colot V.** (2007). Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet.* 3, e86.

**Turck F., Fornara F., y Coupland G.** (2008). Regulation and identity of florigen:FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu Rev Plant Biol* 59, 573-594.

**Turck F., y Coupland G.** (2011). When vernalization makes sense. *Science* 331,36-37.

**Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T, Hsing Y, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M.** (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437:693–698.

**Undurraga SF., Press MO., Legendre M., Bujdoso N., Bale J., Wang H., Davis SJ., Verstrepen KJ., Queitsch C.** (2012). Background-dependent effects of polyglutamine variation in the Arabidopsis thaliana gene ELF3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(47):19363-7. doi: 10.1073/pnas.1211021109.

**Valdés-Mora F., Song JZ., Statham AL., Strbenac D., Robinson MD., Nair SS., Patterson KI., Tremethick DJ., Stirzaker C., y Clark SJ.** (2012). Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. *Genome Res.* 22(2): 307–321. doi: 10.1101/gr.118919.110.

**Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A. y Coupland G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science.* 303, 1003–1006.

**Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33, 949-956.

**Wagner, D.** (2003). Chromatin regulation of plant development. *Curr Opin Plant Biol* 6, 20-28.

**Wan Y, Saleem RA, Ratushny AV, Roda O, Smith JJ, et al.** (2009a) Role of the histone variant H2A.Z/Htz1p in TBP recruitment, chromatin dynamics, and regulated expression of oleate-responsive genes. *Mol Cell Biol* 29: 2346–2358.

**Wang, D., Amornsiripanitch, N. y Dong, X.** (2006) A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathog.* 2, e123.

**Wang X., Zhang Y., Ma Q., Zhang Z., Xue Y., Bao S., y Chong K.** (2007). SKB1-mediated symmetric dimethylation of histone H4R3 controls flowering time in Arabidopsis. *Embo J* 26, 1934-1941.

**Wang J.W., Czech B., y Weigel D.** (2009a). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138, 738-749.

**Wang A.Y., Schulze J.M., Skordalakes E., Gin J.W., Berger J.M., Rine J., Kobor M.S.** (2009b) Asf1-like structure of the conserved Yaf9 YEATS domain and role in H2A.Z deposition and acetylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106. 21573–21578.



- Wang R, Albani MC, Vincent C, Bergonzi S, Luan M, Bai Y, Kiefer C, Castillo R, Coupland G.** (2011). Aa TFL1 confers an age-dependent response to vernalization in perennial *Arabis alpina*. *Plant Cell*. Apr;23(4):1307-21. doi: 10.1105/tpc.111.083451. Epub 2011 Apr 15.
- Warren, C.L., Kratochvil, N.C., Hauschild, K.E., Foister, S., Brezinski, M.L., Dervan, P.B., Phillips, G.N. Jr and Ansari, A.Z.** (2006) Defining the sequence recognition profile of DNA-binding molecules. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 103, 867–872.
- Weigel D., y Nilsson O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377, 495-500.
- Weigel, R.R., Pfitzner, U.M. y Gatz, C.** (2005) Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 1279–1291.
- Wigge PA., Kim MC., Jaeger KE., Busch W., Schmid M., Lohmann JU. y Weigel D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*. 309, 1056–1059.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. y Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562–565.
- Williams CE. y Grotewold E.** (1997). Differences between plant and animal Myb domains are fundamental for DNA binding activity, and chimeric Myb domains have novel DNA binding specificities. *J Biol Chem* 272: 563–571.
- Willige B, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann E, 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 y Somerville CR.** (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol.* 100, 403-408.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, et al.** (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2(8): e718. doi:10.1371/journal.pone.0000718.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, et al.** (2003a). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* 11: 267–274.
- Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A.** (2003b). The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6–Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem* 278: 34739–34742.
- Woodger F. J., Millar A., Murray F., Jacobsen J. V. y Gubler F.** (2003). The role of GAMYB transcription factors in GA-regulated gene expression. *J. Plant Growth Regul.* 22, 176-184.
- Wu G. y Poethig R. S.** (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133, 3539-3547.
- Wu G., Park MY., Conway SR., Wang JW., Weigel D. y Poethig RS.** (2009a). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*. 138(4), 750-759.
- Wu WH, Alami S, Luk E, Wu CH, Sen S, Mizuguchi G, Wei D, Wu C.** (2005). Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nat Struct Mol Biol.* 12(12):1064-71.
- Wu WH., Wu CH., Ladurner A., Mizuguchi G., Wei D., Xiao H., Luk E., Ranjan A., y Wu C.** (2009b). N terminus of Swr1 binds to histone H2AZ and provides a platform for subunit assembly in the chromatin remodeling complex. *The Journal of biological chemistry* 284(10),6200-6207.

**Wu X, Liu M, Downie B, Liang C, Ji G, Li QQ, Hunt AG.** (2011) Genome-wide landscape of polyadenylation in *Arabidopsis* provides evidence for extensive alternative polyadenylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12533–12538

**Xia R., Wang J., Liu C., Wang Y., Wang Y., Zhai J., Liu J., Hong X, Cao X., Zhu J.K. y Gong Z.** (2006). ROR1/RPA2A, a Putative Replication Protein A2, Functions in Epigenetic Gene Silencing and in Regulation of Meristem Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, Vol. 18, 85–103.

**Xu D., Huang W., Li Y., Wang H., Huang H. y Cui X.** (2011). Elongator complex is critical for cell cycle progression and leaf patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04831.x.

**Xu L., Zhao Z., Dong A., Soubigou-Taconnat L., Renou JP., Steinmetz A. y Shen WH.** (2008). Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol.* 28(4), 1348-1360.

**Xu L., Ménard R., Berr A., Fuchs J., Cognat V., Meyer D. y Shen WH.** (2009). The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of *FLC* expression and repression of flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 57(2), 279-288.

**Xu Y., y Price B.D.** (2011). Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* 10, 261–267.

**Xu Y, Ayrapetov MK., Xu C., Gursoy-Yuzugullu O., Hu Y., Price BP.** (2012). Histone H2A.Z Controls a Critical Chromatin Remodeling Step Required for DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>.

**Yaish MW, Colasanti J, Rothstein SJ.** (2011). The role of epigenetic processes in controlling flowering time in plants exposed to stress. *J. Exp. Bot.*;62:3727-3735.

**Yamaguchi A., Kobayashi Y., Goto K., Abe M. y Araki T.** (2005). *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiol.* 46, 1175–1189.

**Yamaguchi A., Wu M.F., Yang L., Wu G., Poethig R.S., y Wagner D.** (2009). The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Dev Cell* 17, 268-278.

**Yang W, Jiang D, Jiang J, He Y.** (2010) A plant-specific histone H3 lysine 4 demethylase represses the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 62, 663–673.

**Yant L., Mathieu J., y Schmid M.** (2009). Just say no: floral repressors help *Arabidopsis* bide the time. *Curr Opin Plant Biol* 12, 580-586.

**Yant L, Mathieu J, Dinh T, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X, Schmid M** (2010) Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *Plant Cell* 22:2156–2170.

**Yoo S.Y, Kim Y., Kim S.Y., Lee J.S., Ahn J.H.** (2007). Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis*, *PLoS ONE* 2 e642.

**Yoshioka, K., Moeder, W., Kang, H.G., Kachroo, P., Masmoudi, K., Berkowitz, G. and Klessig, D.F.** (2006) The chimeric *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED ION CHANNEL11/12 activates multiple pathogen resistance responses. *Plant Cell*, 18, 747–763.

**Yu CW, Liu X, Luo M, Chen C, Lin X, Tian G, Lu Q, Cui Y, Wu K** (2011) HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156, 173–184.

**Yu H., Ito T., Wellmer F. y Meyerowitz EM.** (2004). Repression of *AGAMOUS-LIKE 24* is a crucial step in promoting flower development. *Nat Genet.* 36(2), 157-161.

- Yun H, Hyun Y, Kang MJ, Noh YS, Noh B, Choi Y.** (2011). Identification of regulators required for the reactivation of FLOWERING LOCUS C during Arabidopsis reproduction. *Planta*. Dec;234(6):1237-50. doi: 10.1007/s00425-011-1484-y.
- Yu JW, Rubio V, Lee NY, Bai S, Lee SY, Kim SS, Liu L, Zhang Y, Irigoyen ML, Sullivan JA, Zhang Y, Lee I, Xie Q, Paek NC, Deng XW.** (2008a). COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability, *Mol. Cell* 32 617–630.
- Yu X., Li L., Li L., Guo M., Chory J., Yin Y.** (2008b). Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 7618–7623.
- Yu X. y Michaels S.D.** (2010) The Arabidopsis Paf1c complex component CDC73 participates in the modification of FLOWERING LOCUS C chromatin. *Plant Physiol.* 153, 1074–1084.
- Zacharaki V., Benhamedc M., Poulivos S., Latrassec D, Papoutsogloub P., Delaruec M., Vlachonasiosa KE.** (2012). The Arabidopsis ortholog of the YEATS domain containing protein YAF9a regulates flowering by controlling H4 acetylation levels at the FLC locus; *Plant Science* 196 44–52.
- Zhang H., Ransom C., Ludwig P. y van Nocker S.** (2003). Genetic analysis of early flowering mutants in Arabidopsis defines a class of pleiotropic developmental regulator required for expression of the flowering-time switch *Flowering locus C*. *Genetics*. 164(1), 347-358.
- Zhang H., Richardson D.O., Roberts DN., Utlely R., Erdjument-Bromage H, Tempst P., Côté J., Cairns BR.** (2004). The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres, *Mol. Cell. Biol.* 24 9424–9436.
- Zhang H., Roberts D.N., y Cairns B.R.** (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219–231.
- Zhang K., Sridhar V.V., Zhu J., Kapoor A., y Zhu J.K.** (2007a). Distinctive core histone post-translational modification patterns in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* 2, e1210.
- Zhang X., Clarenz O., Cokus S., Bernatavichute YV., Pellegrini M., Goodrich J. y Jacobsen SE.** (2007b). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in Arabidopsis. *PLoS Biol.* 5(5), e129.
- Zhang X., Germann S., Blus B.J., Khorasanizadeh S., Gaudin V. y Jacobsen S.E.** (2007c). The Arabidopsis LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys 27 trimethylation. *Nat Struct Mol Biol.* 14, 869–871.
- Zhao Z., Yu Y., Meyer D., Wu C. y Shen W.H.** (2005). Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nat. Cell Biol.* 7, 1256-1260.
- Zheng B., Chen X.** (2011). Dynamics of histone H3 lysine 27 trimethylation in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 123–129.
- Zhou BO, Wang SS, Xu LX, Meng FL, Xuan YJ, Duan YM, Wang JY, Hu H, Dong X, Ding J, Zhou JQ.** (2010a) SWR1 complex poises heterochromatin boundaries for antisilencing activity propagation. *Mol Cell Biol.* 30(10):2391-400. doi: 10.1128/MCB.01106-09.
- Zhou J., Wang X., He K., Charron JBF., Elling AA., Deng XW.** (2010b). Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in Arabidopsis reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant Mol Biol* 72:585–595.
- Zhu Y, Weng M, Yang Y, Zhang C, Li Z, Shen WH.** (2011). Dong A Arabidopsis homologues of the histone chaperone ASF1 are crucial for chromatin replication and cell proliferation in plant development. *Plant J.* 66(3):443-55. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04504.x.

**Zilberman D., Coleman-Derr D., Ballinger T. y Henikoff S.** (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*. 456, 125–129.

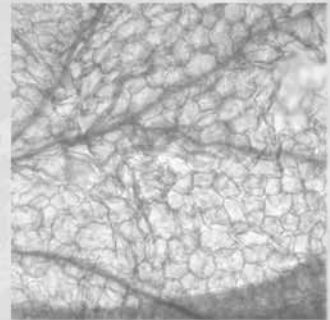
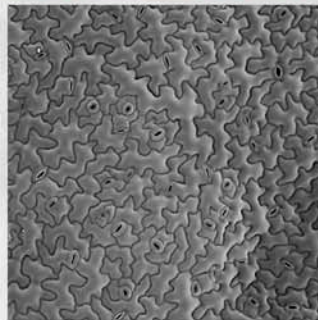
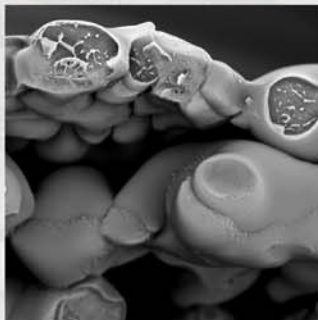
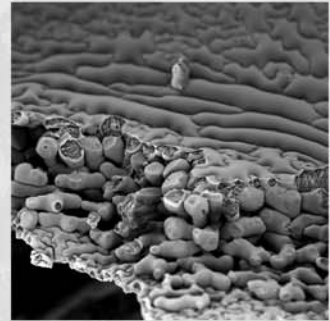
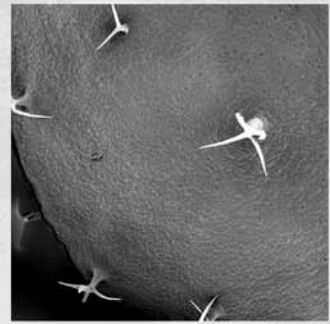
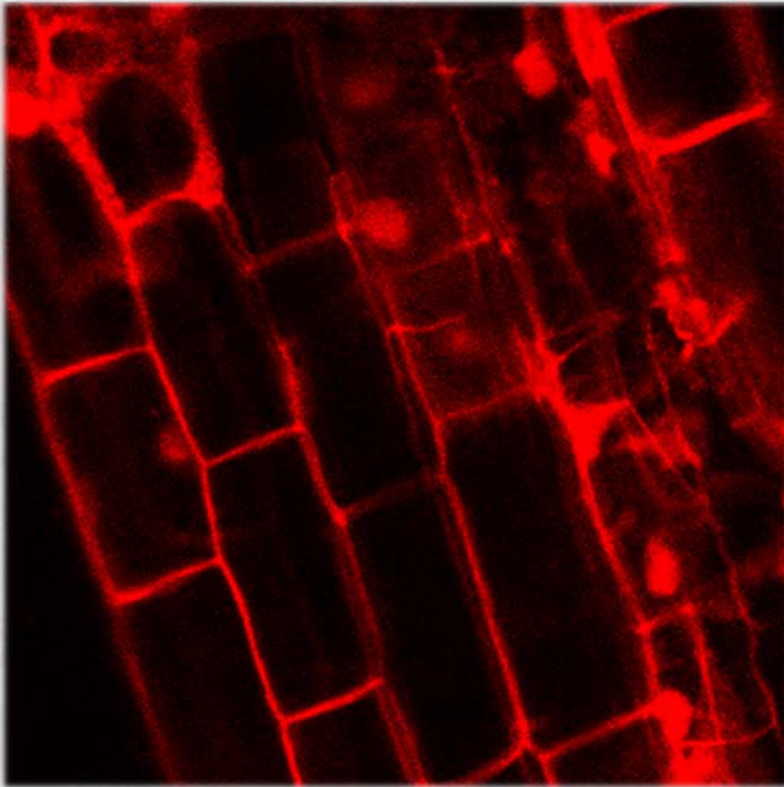
**Zimmermann U., Schneider H., Wegner LH., y Haase A.** (2004). "Water ascent in tall trees: does evolution of land plants rely on a highly metastable state?", *New Phytologist* 162: 575.

**Zlatanova J., y Thakar A.** (2008). H2A.Z: View from the top. *Structure*. 16: 166–179.

**Zografos BR, Sung S.** (2012). Vernalization-mediated chromatin changes. *J Exp Bot.* Jul;63 (12):4343-8. doi: 10.1093/jxb/ers157.

**Zuo ZC, Meng YY, Yu XH, Zhang ZL, Feng DS, Sun SF, Liu B, Lin CT.** (2012). A study of the blue-light-dependent phosphorylation, degradation, and photobody formation of *Arabidopsis* CRY2, *Mol. Plant* 5 726–733.

# ANEXO 1





Fold Change	pval (LiMMA)	pval (RankProd)	ProbeID	Transcript ID	Gene Symbol   Gene Description
+12.03	0.00006429	0.00000000	260856_at	At1g21910	TINY-like protein similar to TINY GB:CAA64359 GI:1246403 from [Arabidopsis thaliana];supported by full-length cDNA: Ceres:19721.
+9.03	0.00000168	0.00000000	258383_at	At3g15440	hypothetical protein predicted by genscan+
+8.49	0.00000033	0.00000000	247814_at	At5g58310	MES18   MES18 (METHYL ESTERASE 18); hydrolase/ hydrolase, acting on ester bonds / methyl indole-3-acetate esterase
+8.37	0.00000152	0.00000000	245325_at	At4g14130	XTR7   XTR7 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+7.64	0.00022809	0.00000000	245757_at	At1g35140	PHI-1   PHI-1 (PHOSPHATE-INDUCED 1)
+7.53	0.00310823	0.00000000	259729_at	At1g77640	hypothetical protein predicted by genefinder
+7.49	0.00008646	0.00000000	266901_at	At2g34600	JAZ7   JAZ7 (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7)
+7.07	0.00000009	0.00000000	266814_at	At2g44910	ATHB4   ATHB4 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER PROTEIN 4); DNA binding / transcription factor
+6.44	0.00194577	0.00000000	265837_at	At2g14560	LURP1   LURP1 (LATE UPREGULATED IN RESPONSE TO HYALOPERONOSPORA PARASITICA)
+5.48	0.00015865	0.00000000	255177_at	At4g08040	ACS11   ACS11; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
+5.44	0.00000363	0.00000000	245276_at	At4g16780	ATHB-2   ATHB-2 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2); DNA binding / protein homodimerization/ sequence-specific DNA binding / transcription factor
+5.39	0.00001274	0.00000000	252549_at	At3g45860	protein kinase - like receptor-like protein kinase RLK3, Arabidopsis thaliana, EMBL:ATH011674
+5.36	0.00002846	0.00000000	252563_at	At3g45970	ATEXLA1   ATEXLA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE A1)
+5.13	0.00001633	0.00000000	246072_at	At5g20240	PI   PI (PISTILLATA); DNA binding / transcription factor
+4.98	0.00000268	0.00000000	257382_at	At2g40750	WRKY54   WRKY54; transcription factor
+4.97	0.00001368	0.00000000	255064_at	At4g08950	EXO   EXO (EXORDIUM)
+4.87	0.00000003	0.00000000	257076_at	At3g19680	unknown protein
+4.84	0.00070302	0.00000018	266316_at	At2g27080	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15450380_gb_AY052291.1
+4.77	0.00000491	0.00000018	263584_at	At2g17040	anac036   anac036 (Arabidopsis NAC domain containing protein 36); transcription factor
+4.74	0.00000021	0.00000018	247919_at	At5g57650	putative protein similar to unknown protein (sp Q38884 IF32_ARATH)
+4.50	0.00003640	0.00000018	260914_at	At1g02640	BXL2   BXL2 (BETA-XYLOSIDASE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
+4.48	0.00000788	0.00000018	254931_at	At4g11460	---   serine/threonine kinase-like protein receptor-like protein kinase RLK3 - Arabidopsis thaliana,PID:e1363211
+4.47	0.00000007	0.00000018	264166_at	At1g65370	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_15810005_gb_AY054271.1
+4.44	0.00040172	0.00000035	247684_at	At5g59670	---   serine/threonine-specific protein kinase - like putative protein serine /threonine kinase, Sorghum bicolor, EMBL:SBRLK1
+4.42	0.00000164	0.00000018	266545_at	At2g35290	---   hypothetical protein predicted by genefinder
+4.40	0.00057840	0.00000018	248062_at	At5g55450	---   unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:4309.
+4.38	0.00000044	0.00000018	246603_at	At1g31690	---   copper amine oxidase, putative similar to copper amine oxidase GI:3819099 from [Cicer arietinum]
+4.22	0.00001547	0.00000035	246200_at	At4g37240	---   putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:16131.

## ANEXO 1

+4.18	0.00022049	0.00000035	245265_at	At4g14400	ACD6   ACD6 (ACCELERATED CELL DEATH 6); protein binding
+4.18	0.00080210	0.00000018	256766_at	At3g22231	PCC1   PCC1 (PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1)
+4.14	0.00003910	0.00000053	264214_s_at	At1g65330	AGL38   AGL38 (AGAMOUS-LIKE 38); DNA binding / transcription factor
+4.07	0.00000064	0.00000035	266772_s_at	At2g03020	---   predicted by genefinder
+4.00	0.00000280	0.00000053	252160_at	At3g50570	---   proline-rich protein
+3.99	0.00633621	0.00000175	254042_at	At4g25810	XTR6   XTR6 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 6); hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+3.74	0.00075979	0.00000140	260656_at	At1g19380	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm
+3.74	0.00000040	0.00000105	247640_at	At5g60610	---   putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:142077.
+3.70	0.00015684	0.00000123	251124_s_at	At5g01040	LAC8   LAC8 (laccase 8); laccase
+3.70	0.00000044	0.00000123	253713_at	At4g29370	---   putative protein several hypothetical proteins - Arabidopsis thaliana
+3.70	0.00000017	0.00000123	265588_at	At2g19970	---   putative pathogenesis-related protein
+3.68	0.00000515	0.00000123	253423_at	At4g32280	IAA29   IAA29 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29); transcription factor
+3.67	0.00000911	0.00000123	255941_at	At1g20350	ATTIM17-1   ATTIM17-1; P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter/ protein transporter
+3.64	0.00000018	0.00000123	260046_at	At1g73800	---   Expressed protein ; supported by cDNA: gi_16648699_gb_AY058126.1
+3.63	0.00000001	0.00000123	258327_at	At3g22640	PAP85   PAP85; nutrient reservoir
+3.57	0.00455097	0.00000210	254231_at	At4g23810	WRKY53   WRKY53; DNA binding / protein binding / transcription activator/ transcription factor
+3.56	0.00003328	0.00000158	261986_s_at	At1g33720	CYP76C5   CYP76C5; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
+3.54	0.00013256	0.00000175	250327_at	At5g12050	---   putative serine rich protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:36958.
+3.47	0.00009322	0.00000175	247866_at	At5g57550	XTR3   XTR3 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 3); hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+3.47	0.00000326	0.00000175	254001_at	At4g26260	MIOX4   MIOX4; inositol oxygenase
+3.45	0.00016790	0.00000175	263981_at	At2g42870	PAR1   PAR1 (PHY RAPIDLY REGULATED 1)
+3.44	0.05128241	0.00001333	253628_at	At4g30280	XTH18 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE/HYDROLASE 18); hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+3.38	0.00000357	0.00000175	245362_at	At4g17460	HAT1   HAT1; DNA binding / transcription factor
+3.37	0.00013026	0.00000193	247553_at	At5g60910	AGL8   AGL8 (agamous-like 8); transcription factor
+3.35	0.00001000	0.00000175	256098_at	At1g13700	---   unknown protein similar to 6-phosphogluconolactonase-like protein GI:10177902 from [Arabidopsis thaliana]
+3.33	0.00208233	0.00000351	253485_at	At4g31800	WRKY18   WRKY18; transcription factor
+3.30	0.00072861	0.00000281	263207_at	At1g10550	XTH33   XTH33; hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+3.29	0.00049625	0.00000263	267076_at	At2g41090	---   calcium binding protein (CaBP-22) identical to GB:Z12136;supported by full-length cDNA: Ceres:123659.
+3.21	0.00012270	0.00000281	261658_at	At1g50040	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm



+3.18	0.00000022	0.00000263	264433_at	At1g61810	BGLU45   BGLU45 (BETA-GLUCOSIDASE 45); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
+3.15	0.00002246	0.00000298	250777_at	At5g05440	---   putative protein similar to unknown protein (pir T02514);supported by full-length cDNA: Ceres:117347.
+3.13	0.00002352	0.00000316	261339_at	At1g35710	---   protein kinase, putative similar to many predicted protein kinases
+3.13	0.00039787	0.00000298	257947_at	At3g21720	ICL   ICL (ISOCITRATE LYASE); catalytic/ isocitrate lyase
+3.12	0.00000333	0.00000316	259766_at	At1g64360	---   unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:10323.
+3.09	0.00001036	0.00000316	249337_at	At5g41080	---   putative protein contains similarity to unknown protein (gb AAF14831.1)
+3.08	0.00188867	0.00000631	265597_at	At2g20145	---   Expressed protein ; supported by cDNA: gi_13605516_gb_AF361584.1_AF361584
+3.06	0.00000457	0.00000368	252520_at	At3g46370	---   receptor-like protein kinase homolog light repressible receptor protein kinase - Arabidopsis thaliana, PIR:S71277
+3.01	0.00002186	0.00000473	250182_at	At5g14470	---   putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana and Phalaenopsis sp.
+3.00	0.00000128	0.00000473	258380_at	At3g16650	---   PP1/PP2A phosphatases pleiotropic regulator PRL2 identical to GB:Q39190 from [Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_15809827_gb_AY054181.1
+3.00	0.00003570	0.00000473	266246_at	At2g27690	CYP94C1   CYP94C1; fatty acid (omega-1)-hydroxylase/ oxygen binding
+2.99	0.00005955	0.00000509	250199_at	At5g14180	MPL1   MPL1 (MYZUS PERSICAE-INDUCED LIPASE 1); catalytic
+2.97	0.00503822	0.00001228	245329_at	At4g14365	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 37809.
+2.95	0.00000561	0.00000509	259076_at	At3g02140	TMAC2   TMAC2 (TWO OR MORE ABRES-CONTAINING GENE 2)
+2.94	0.00006656	0.00000631	253047_at	At4g37295	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 263956.
+2.93	0.00216284	0.00000982	251196_at	At3g62950	---   glutaredoxin -like protein glutaredoxin, castor bean, PIR:S54825
+2.92	0.00000134	0.00000526	252951_at	At4g38700	---   disease resistance response like protein disease resistance response protein 206-d - Pisum sativum, PID:g508844
+2.90	0.02829360	0.00002280	252511_at	At3g46280	---   putative protein serine/threonine-specific protein kinase (EC 2.7.1.-) Irrpk, Arabidopsis thaliana, PIR:T08975
+2.90	0.00413392	0.00001719	249955_at	At5g18840	---   sugar transporter - like protein probable sugar transporter protein, Beta vulgaris, PIR:T14545;supported by full-length cDNA: Ceres:3250.
+2.90	0.00006151	0.00000649	252997_at	At4g38400	ATEXLA2   ATEXLA2 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE A2)
+2.88	0.00002028	0.00000859	249065_at	At5g44260	---   putative protein similar to unknown protein (gb AAD10689.1); supported by cDNA: gi_14334449_gb_AY034916.1
+2.88	0.00000153	0.00000666	263016_at	At1g23410	---   ubiquitin extension protein, putative similar to ubiquitin extension protein (UBQ5) GB:AAA32906 GI:166934 from (Arabidopsis thaliana);supported by full-length cDNA: Ceres:1496.
+2.87	0.00221722	0.00001228	266693_at	At2g19800	MIOX2   MIOX2 (MYO-INOSITOL OXYGENASE 2); inositol oxygenase
+2.87	0.00009354	0.00000824	262694_at	At1g62790	---   unknown protein
+2.87	0.00000315	0.00000666	258751_at	At3g05890	RCI2B   RCI2B (RARE-COLD-INDUCIBLE 2B)
+2.85	0.00004040	0.00001017	256569_at	At3g19550	---   hypothetical protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 14577.
+2.84	0.00351676	0.00002017	255524_at	At4g02330	ATPMEPCRB   ATPMEPCRB; pectinesterase
+2.83	0.00004253	0.00000964	259417_at	At1g02340	HFR1   HFR1 (LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED); DNA binding / protein binding / transcription factor
+2.83	0.00002143	0.00000912	267472_at	At2g02850	ARPN   ARPN (PLANTACYANIN); copper ion binding / electron carrier

ANEXO 1

+2.81	0.00000875	0.00000964	260011_at	At1g68110	hypothetical protein similar to hypothetical GB:AAD26976 [Arabidopsis thaliana]; contains Pfam profile: PF01417 ENTH domain, involvement in endocytosis or cytoskeletal machinery; supported by cDNA: gi_15294173_gb_AF410278.1_AF4102
+2.80	0.00002210	0.00001035	263953_at	At2g36050	OFF15   OFF15 (ARABIDOPSIS THALIANA OVATE FAMILY PROTEIN 15)
+2.78	0.00002261	0.00001035	247800_at	At5g58570	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 17636.
+2.76	0.00023378	0.00001385	255080_at	At4g09030	AGP10   AGP10 (ARABINOGALACTAN PROTEIN 10)
+2.75	0.00278982	0.00002595	248392_at	At5g52050	---   integral membrane protein-like
+2.75	0.00166157	0.00001701	253061_at	At4g37610	BT5   BT5 (BTB AND TAZ DOMAIN PROTEIN 5); protein binding / transcription regulator
+2.74	0.01290662	0.00003700	264213_at	At1g65400	ATPP2-A5   ATPP2-A5 (ARABIDOPSIS THALIANA PHLOEM PROTEIN 2 A5); carbohydrate binding
+2.74	0.00006020	0.00001263	254255_at	At4g23220	---   serine/threonine kinase - like protein serine/threonine kinase, Brassica oleracea; supported by cDNA: gi_14423417_gb_AF386946.1_AF386946
+2.74	0.00001875	0.00001228	254948_at	At4g11000	---   putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana
+2.73	0.00251385	0.00001964	259561_at	At1g21250	WAK1   WAK1 (CELL WALL-ASSOCIATED KINASE); kinase
+2.73	0.00007863	0.00001613	249532_at	At5g38780	---   AtPP - like protein AtPP protein, Brassica napus, EMBL:BNA245479
+2.72	0.00009448	0.00001420	258856_at	At3g02040	SRG3   SRG3 (senescence-related gene 3); glycerophosphodiester phosphodiesterase/ phosphoric diester hydrolase
+2.71	0.00009343	0.00001578	260915_at	At1g02660	---   hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:CAB83109 GI:7362739 from [Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_15081706_gb_AY048246.1
+2.69	0.00020192	0.00001683	249583_at	At5g37770	TCH2   TCH2 (TOUCH 2); calcium ion binding
+2.69	0.00005455	0.00001648	266616_at	At2g29680	CDC6   CDC6 (CELL DIVISION CONTROL 6)
+2.69	0.00007507	0.00001508	247524_at	At5g61440	ACHT5   ACHT5 (ATYPICAL CYS HIS RICH THIOREDOXIN 5)
+2.68	0.00041817	0.00002087	263800_at	At2g24600	---   hypothetical protein predicted by genscan; supported by cDNA: gi_15810330_gb_AY056204.1
+2.63	0.00073340	0.00002999	253066_at	At4g37770	ACS8   ACS8; 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
+2.63	0.00072925	0.00002718	245119_at	At2g41640	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_16930450_gb_AF419579.1_AF419579
+2.63	0.00001189	0.00001806	246633_at	At1g29720	---   hypothetical protein ; supported by cDNA: gi_13605878_gb_AF367338.1_AF367338
+2.63	0.00000086	0.00001701	254785_at	At4g12730	FLA2   FLA2 (FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN 2)
+2.61	0.00261961	0.00003051	256617_at	At3g22240	---   unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 368.
+2.61	0.00003606	0.00002017	251750_at	At3g55710	---   glucuronosyl transferase - like protein glucuronosyl transferase homolog, Lycopersicon esculentum, PIR:S39507
+2.60	0.00000726	0.00001894	245176_at	At2g47440	---   unknown protein similar to GP 2104534 AF001308 (T10M13.11)
+2.59	0.00065459	0.00002841	256337_at	At1g72060	---   unknown protein
+2.59	0.00001437	0.00002069	263467_at	At2g31730	---   unknown protein
+2.58	0.00016546	0.00002630	261567_at	At1g33055	---   Expressed protein ; supported by cDNA: gi_13877526_gb_AF370464.1_AF370464
+2.58	0.00045804	0.00002420	263593_at	At2g01860	EMB975   EMB975 (EMBRYO DEFECTIVE 975)
+2.57	0.00045912	0.00003157	264434_at	At1g10340	---   hypothetical protein predicted by genscan; supported by cDNA: gi_13937239_gb_AF372975.1_AF372975
+2.57	0.00001020	0.00002262	248236_at	At5g53870	---   putative protein contains similarity to phytoeyanin/early nodulin-like protein

+2.55	0.00052516	0.00003104	254770_at	At4g13340	---   extensin-like protein extensin-like protein, Zea mays, PIR2:S49915
+2.55	0.00079758	0.00002771	248520_at	At5g50600	AtHSD1   AtHSD1 (hydroxysteroid dehydrogenase 1); binding / catalytic/ oxidoreductase
+2.55	0.00004837	0.00002736	261728_at	At1g76160	sks5   sks5 (SKU5 Similar 5); copper ion binding / oxidoreductase
+2.54	0.00011611	0.00002841	265405_at	At2g16750	---   putative protein kinase contains a protein kinase domain profile (PDOC00100)
+2.51	0.00626032	0.00006366	256969_at	At3g21080	---   unknown protein
+2.51	0.00035575	0.00003297	247925_at	At5g57560	TCH4   TCH4 (Touch 4); hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+2.51	0.00000091	0.00002560	262121_at	At1g02800	ATCEL2   ATCEL2; cellulase/ hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
+2.50	0.00023391	0.00003314	248916_at	At5g45840	---   receptor protein kinase-like protein predicted by genemarkHMM and genscan+
+2.49	0.00044953	0.00003402	260427_at	At1g72430	---   hypothetical protein predicted by genefinder;supported by full-length cDNA: Ceres:99920.
+2.49	0.00000056	0.00002771	266627_at	At2g35340	MEE29   MEE29 (maternal effect embryo arrest 29); ATP binding / ATP-dependent RNA helicase/ ATP-dependent helicase/ helicase/ nucleic acid binding
+2.49	0.00000076	0.00002701	264071_at	At2g27920	SCPL51   SCPL51 (SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 51); serine-type carboxypeptidase
+2.48	0.00854788	0.00009206	253405_at	At4g32800	---   transcription factor TINY homolog transcription factor TINY - Arabidopsis thaliana, PIR2:T01076;supported by full-length cDNA: Ceres:99612.
+2.48	0.00001869	0.00003157	263194_at	At1g36060	---   AP2 domain transcription factor, putative similar to AP2 domain transcription factor GI:4567204 from [Arabidopsis thaliana]
+2.47	0.00024820	0.00003963	264580_at	At1g05340	---   unknown protein EST gb ATTS0295 comes from this gene;supported by full-length cDNA: Ceres:20380.
+2.47	0.00005188	0.00003279	251705_at	At3g56400	WRKY70   WRKY70; transcription factor/ transcription repressor
+2.47	0.00000217	0.00003051	264375_at	At2g25090	CIPK16   CIPK16 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 16); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase
+2.46	0.00005189	0.00003612	259106_at	At3g05490	RALFL22   RALFL22 (ralf-like 22); signal transducer
+2.45	0.00000359	0.00003192	245891_at	At5g09220	AAP2   AAP2 (AMINO ACID PERMEASE 2); amino acid transmembrane transporter
+2.45	0.00000267	0.00003139	245084_at	At2g23290	AtMYB70   AtMYB70 (myb domain protein 70); DNA binding / transcription factor
+2.44	0.00004965	0.00004086	251861_at	At3g54810	BME3   zinc finger (GATA type) family protein
+2.44	0.00001169	0.00003507	255818_at	At2g33570	---   hypothetical protein predicted by genefinder and genscan;supported by full-length cDNA: Ceres:119054.
+2.43	0.00154269	0.00005226	264958_at	At1g76960	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_13926184_gb_AF370567.1_AF370567
+2.42	0.00000290	0.00003577	255511_at	At4g02075	PIT1   PIT1 (pitchoun 1); protein binding / zinc ion binding
+2.41	0.00024314	0.00004454	255506_at	At4g02130	GATL6   GATL6; polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups / transferase, transferring hexosyl groups
+2.41	0.00000115	0.00003665	245089_at	At2g45290	---   putative transketolase precursor ; supported by cDNA: gi_15982841_gb_AY057528.1
+2.39	0.00036071	0.00005541	249375_at	At5g40730	AGP24   AGP24
+2.39	0.00003798	0.00004367	247266_at	At5g64570	XYL4   XYL4; hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xylan 1,4-beta-xylosidase
+2.39	0.00000712	0.00004033	252193_at	At3g50060	MYB77   MYB77; DNA binding / transcription factor
+2.39	0.00000119	0.00003735	258953_at	At3g01430	---   hypothetical protein predicted by genscan
+2.38	0.00001620	0.00004174	253806_at	At4g28270	---   putative protein Arabidopsis thaliana RMA1 mRNA, PID:d1029538
+2.38	0.00000293	0.00004103	263421_at	At2g17230	EXL5   EXL5 (EXORDIUM LIKE 5)

## ANEXO 1

+2.38	0.00000192	0.00003893	262357_at	At1g73040	---   jacalin, putative similar to jacalin GI:289164 from [Artocarpus heterophyllus]
+2.37	0.00009707	0.00004893	257964_at	At3g19850	---   hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAD50054 from [Arabidopsis thaliana]
+2.36	0.00037188	0.00005313	249894_at	At5g22580	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_14190416_gb_AF378886.1_AF378886
+2.35	0.00447943	0.00008943	264636_at	At1g65490	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm;supported by full-length cDNA: Ceres:2118.
+2.35	0.00035905	0.00006576	262947_at	At1g75750	GASA1   GASA1 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 1)
+2.33	0.00045603	0.00006594	252924_at	At4g39070	---   putative zinc finger protein salt-tolerance protein - Arabidopsis thaliana, PID:e224078
+2.33	0.00064693	0.00006488	255568_at	At4g01250	WRKY22   WRKY22; transcription factor
+2.33	0.00000577	0.00005191	260683_at	At1g17560	HLL   HLL (HUELLENLOS); structural constituent of ribosome
+2.32	0.00052466	0.00007839	265028_at	At1g24530	---   hypothetical protein predicted by genefinder; supported by cDNA: gi_15028340_gb_AY045973.1
+2.32	0.00006131	0.00006646	249783_at	At5g24270	SOS3   SOS3 (SALT OVERLY SENSITIVE 3); calcium ion binding / calcium-dependent protein serine/threonine phosphatase
+2.31	0.00013367	0.00006944	247189_at	At5g65390	AGP7   AGP7
+2.31	0.00009394	0.00006734	247208_at	At5g64870	---   nodulin-like ;supported by full-length cDNA: Ceres:142026.
+2.31	0.00022640	0.00006541	245970_at	At5g20710	BGAL7   BGAL7 (beta-galactosidase 7); beta-galactosidase
+2.31	0.00005498	0.00006295	257697_at	At3g12700	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm
+2.31	0.00000952	0.00005734	249777_at	At5g24210	---   putative protein similar to unknown protein (gb AAD29063.1)
+2.31	0.00000773	0.00005541	254197_at	At4g24040	TRE1   TRE1 (TREHALASE 1); alpha,alpha-trehalase/ trehalase
+2.31	0.00001094	0.00005401	261000_at	At1g26540	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm
+2.30	0.05759242	0.00021043	249082_at	At5g44120	CRA1   CRA1 (CRUCIFERINA); nutrient reservoir
+2.30	0.00013659	0.00006295	251142_at	At5g01015	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 32396.
+2.29	0.00099654	0.00008891	253608_at	At4g30290	XTH19   XTH19 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 19); hydrolase, acting on glycosyl bonds / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+2.29	0.00000091	0.00005559	254041_at	At4g25830	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 9546.
+2.28	0.00028307	0.00007733	246926_at	At5g25240	---   putative protein
+2.28	0.00000626	0.00006471	245925_at	At5g28770	BZO2H3   BZO2H3; DNA binding / protein heterodimerization/ transcription factor
+2.27	0.00695374	0.00017413	248932_at	At5g46050	PTR3   PTR3 (PEPTIDE TRANSPORTER 3); dipeptide transporter/ transporter/ tripeptide transporter
+2.27	0.00036762	0.00009136	265841_at	At2g35710	---   putative glycogenin
+2.27	0.00000235	0.00006295	245523_at	At4g15910	ATDI21   ATDI21 (ARABIDOPSIS THALIANA DROUGHT-INDUCED 21)
+2.26	0.00269354	0.00014204	249765_at	At5g24030	SLAH3   SLAH3 (SLAC1 HOMOLOGUE 3); transporter
+2.25	0.00296422	0.00015572	263536_at	At2g25000	WRKY60   WRKY60; transcription factor
+2.25	0.00648725	0.00011697	267460_at	At2g33810	SPL3   SPL3 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3); DNA binding / transcription factor
+2.25	0.00038145	0.00008996	251012_at	At5g02580	---   putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:16476.
+2.24	0.00004635	0.00009189	251192_at	At3g62720	XT1   XT1 (XYLOSYLTRANSFERASE 1); UDP-xylosyltransferase/ transferase/ transferase, transferring glycosyl groups / xyloglucan 6-xylosyltransferase
+2.24	0.00042073	0.00009101	245444_at	At4g16740	ATTPS03   ATTPS03; (E)-beta-ocimene synthase/ myrcene synthase

+2.24	0.00001966	0.00008680	266613_at	At2g14900	---   similar to gibberellin-regulated proteins
+2.24	0.00001274	0.00006892	253794_at	At4g28720	---   putative protein dimethylaniline monooxygenase (N-oxide-forming), <i>Sus scrofa domestica</i> , PIR1:A33768
+2.23	0.00080280	0.00013608	253571_at	At4g31000	---   putative calmodulin-binding protein calmodulin-binding protein, <i>Nicotiana tabacum</i>
+2.23	0.00103391	0.00011714	260908_at	At1g02580	MEA   MEA (MEDEA); sequence-specific DNA binding / transcription factor
+2.22	0.00305009	0.00013731	249780_at	At5g24240	---   ubiquitin
+2.22	0.00016887	0.00010031	266140_at	At2g28120	---   nodulin-like protein ; supported by cDNA: gi_16209713_gb_AY057618.1
+2.22	0.00029309	0.00009575	248186_at	At5g53880	---   unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:31129.
+2.22	0.00007823	0.00009206	248347_at	At5g52250	---   putative protein contains similarity to photomorphogenesis repressor COP1;supported by full-length cDNA: Ceres:32842.
+2.22	0.00001042	0.00008558	259423_at	At1g13880	---   unknown protein similar to putative MYB family transcription factor GI:4335752 from [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]
+2.21	0.00003538	0.00008715	249862_at	At5g22920	---   PGPD14 protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:41666.
+2.20	0.00297085	0.00020237	266658_at	At2g25735	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 7152.
+2.18	0.00100251	0.00011960	262113_at	At1g02820	---   late embryogenis abundant protein, putative similar to late embryogenis abundant protein 5 GI:2981167 from [ <i>Nicotiana tabacum</i> ];supported by full-length cDNA: Ceres:96540.
+2.18	0.00008299	0.00011626	267254_at	At2g23030	SNRK2.9   SNRK2.9 (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.9); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase
+2.18	0.00012099	0.00010925	258897_at	At3g05730	---   unknown protein
+2.18	0.00017657	0.00010592	262201_at	At2g01120	ORC4   ORC4 (ORIGIN RECOGNITION COMPLEX SUBUNIT 4); protein binding
+2.18	0.00000593	0.00010346	252629_at	At3g44970	---   cytochrome P450 - like protein cytochrome P450 d13695c, <i>Arabidopsis thaliana</i> , PIR:C71417
+2.17	0.00008605	0.00012223	256275_at	At3g12110	ACT11   ACT11 (actin-11); structural constituent of cytoskeleton
+2.17	0.00010288	0.00011434	251961_at	At3g53620	AtPPa4   AtPPa4 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> pyrophosphorylase 4); inorganic diphosphatase
+2.17	0.00000595	0.00010294	263431_at	At2g22170	---   unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:15081.
+2.17	0.00000103	0.00010048	256970_at	At3g21090	---   ABC transporter, putative similar to ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 GB:NP_036050 from [ <i>Mus musculus</i> ]
+2.16	0.00998747	0.00026918	255595_at	At4g01700	---   putative chitinase similar to peanut type II chitinase, GenBank accession number X82329, E.C. 3.2.1.14
+2.16	0.00005078	0.00012275	251035_at	At5g02220	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 147593.
+2.16	0.00000528	0.00010662	251235_at	At3g62860	---   putative protein lysophospholipase homolog - <i>Oryza sativa</i> , PIR:T02661
+2.15	0.00529707	0.00020149	264704_at	At1g70090	LGT8   LGT8 (GLUCOSYL TRANSFERASE FAMILY 8); polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups / transferase, transferring hexosyl groups
+2.15	0.00033482	0.00012749	263674_at	At2g04790	---   hypothetical protein predicted by genefinder
+2.14	0.01053551	0.00033529	267385_at	At2g44380	---   unknown protein highly similar to GP 2435515 AF024504
+2.14	0.00038572	0.00014432	254193_at	At4g23870	---   putative protein predicted proteins, <i>Arabidopsis thaliana</i> ; supported by cDNA: gi_15450915_gb_AY054538.1
+2.14	0.00001877	0.00014046	267483_at	At2g02810	UTR1   UTR1 (UDP-GALACTOSE TRANSPORTER 1); UDP-galactose transmembrane transporter/ UDP-glucose transmembrane transporter/ pyrimidine nucleotide sugar transmembrane transporter
+2.13	0.00005990	0.00016449	256789_at	At3g13672	---   seven in absentia-like protein similar to SINA1p GB:CAB40577 from [ <i>Vitis vinifera</i> ]; supported by cDNA: gi_16323493_gb_AY059135.1

ANEXO 1

+2.13	0.00015701	0.00015379	260472_at	At1g10990	---   hypothetical protein predicted by genefinder and genscan
+2.13	0.00006808	0.00014906	265066_at	At1g03870	FLA9   FLA9 (FASCICLIN-LIKE ARABINOOGALACTAN 9)
+2.13	0.00010912	0.00014695	264774_at	At1g22890	---   unknown protein
+2.13	0.00001093	0.00012153	265672_at	At2g31980	---   putative cysteine proteinase inhibitor B (cystatin B) ;supported by full-length cDNA: Ceres:35447.
+2.13	0.00001899	0.00011925	249094_at	At5g43890	YUC5   YUCCA5; monooxygenase
+2.12	0.05437874	0.00061289	256522_at	At1g66160	CMPG1   U-box domain-containing protein
+2.12	0.00717148	0.00029987	265611_at	At2g25510	---   unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:10730.
+2.12	0.00178523	0.00018097	264238_at	At1g54740	---   hypothetical protein predicted by genscan+
+2.12	0.00027628	0.00016765	246987_at	At5g67300	MYBR1   MYBR1 (MYB DOMAIN PROTEIN R1); DNA binding / transcription factor
+2.12	0.00030407	0.00016326	260211_at	At1g74440	---   hypothetical protein similar to YGL010w-like protein GB:AAC32136 [Picea mariana]
+2.12	0.00002022	0.00013643	259996_at	At1g67910	---   hypothetical protein predicted by genefinder
+2.11	0.01121865	0.00046909	267393_at	At2g44500	---   similar to axi 1 protein from Nicotiana tabacum
+2.11	0.00001825	0.00014169	245784_at	At1g32190	---   hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAD18105 GI:4337191 from [Arabidopsis thaliana]
+2.10	0.00509431	0.00028040	263776_s_at	At2g46440	ATCNGC3   ATCNGC3 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL 3); calmodulin binding / cyclic nucleotide binding / ion channel
+2.10	0.00198704	0.00024480	259661_at	At1g55265	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 14943.
+2.10	0.00129304	0.00024463	246001_at	At5g20790	---   putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:267031.
+2.10	0.00420385	0.00024042	250868_at	At5g03860	MLS   MLS (MALATE SYNTHASE); malate synthase
+2.10	0.00004401	0.00016484	266629_at	At2g35590	---   putative serpin
+2.10	0.00005245	0.00016326	248179_at	At5g54380	THE1   THE1 (THESEUS1); kinase/ protein kinase
+2.10	0.00005056	0.00015169	246253_at	At4g37260	MYB73   MYB73 (MYB DOMAIN PROTEIN 73); DNA binding / transcription factor
+2.10	0.00000274	0.00015081	257129_at	At3g20100	CYP705A19   CYP705A19; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
+2.09	0.00007109	0.00017291	259169_at	At3g03520	---   unknown protein similar to unknown protein GB:AAC32238 (Arabidopsis thaliana)
+2.08	0.00188871	0.00023954	262760_at	At1g10770	---   hypothetical protein contains similarity to pectinesterase GI:9759184 from (Arabidopsis thaliana);supported by full-length cDNA: Ceres:1989.
+2.08	0.00053434	0.00022131	252862_at	At4g39830	---   putative L-ascorbate oxidase L-ascorbate oxidase, Cucumis sativus, PIR1:KSKVAO
+2.08	0.00017504	0.00021780	259915_at	At1g72790	---   unknown protein
+2.08	0.00000516	0.00016607	256887_at	At3g15150	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm
+2.06	0.05459957	0.00070232	254120_at	At4g24570	DIC2   mitochondrial substrate carrier family protein
+2.06	0.05117399	0.00049347	250500_at	At5g09530	---   periaxin - like protein periaxin, Rattus norvegicus, PIR:I58157; supported by cDNA: gj_15451135_gb_AY054648.1
+2.06	0.00804392	0.00046646	263391_at	At2g11810	MGDC   MGDC; 1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase
+2.06	0.00215670	0.00036738	262887_at	At1g14780	---   hypothetical protein
+2.06	0.00035824	0.00020535	264339_at	At1g70290	TPS8   ATTPS8; alpha.alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)/ transferase, transferring glycosyl groups / trehalose-phosphatase

+2.06	0.00045116	0.00020342	246025_at	At5g21150	---   zwille/pinhead-like protein GERp95 - Rattus norvegicus, EMBL:AF195534
+2.06	0.00000264	0.00019430	266371_at	At2g41410	---   calmodulin-like protein identical to GB:X68054;supported by full-length cDNA: Ceres:11537.
+2.06	0.00003936	0.00019185	258225_at	At3g15630	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_15529233_gb_AY052241.1
+2.06	0.00010338	0.00017291	249245_at	At5g42280	---   putative protein contains similarity to CHP-rich zinc finger protein
+2.05	0.01685126	0.00045910	254314_at	At4g22470	---   extensin - like protein hybrid proline-rich protein, Zea mays, PIR2:JQ1663
+2.05	0.00438245	0.00043840	246993_at	At5g67450	AZF1   AZF1 (ARABIDOPSIS ZINC-FINGER PROTEIN 1); DNA binding / nucleic acid binding / transcription factor/ transcription repressor/ zinc ion binding
+2.05	0.00367949	0.00036405	260754_at	At1g49000	---   unknown protein
+2.05	0.00005165	0.00023902	247848_at	At5g58120	---   resistance protein - like disease resistance protein RPP1-WsA, Arabidopsis thaliana, EMBL:AF098962
+2.05	0.00001250	0.00021482	261114_at	At1g75390	AtbZIP44   AtbZIP44 (Arabidopsis thaliana basic leucine-zipper 44); DNA binding / protein heterodimerization/ transcription factor
+2.05	0.00000186	0.00021184	262213_at	At1g74870	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm
+2.04	0.05158286	0.00079036	248327_at	At5g52750	---   putative protein similar to unknown protein (emb CAA71173.1);supported by full-length cDNA: Ceres:19542.
+2.04	0.00305865	0.00038317	254243_at	At4g23210	CRK13   protein kinase family protein
+2.04	0.00022830	0.00022060	249234_at	At5g42200	---   putative protein similar to unknown protein (gb AAF16660.1);supported by full-length cDNA: Ceres:4267.
+2.04	0.00000591	0.00020640	248263_at	At5g53370	PMEPCRFB   PMEPCRFB (PECTIN METHYLESTERASE PCR FRAGMENT F); pectinesterase
+2.03	0.08889314	0.00099395	259120_at	At3g02240	---   unknown protein
+2.03	0.00182076	0.00031776	267260_at	At2g23130	AGP17   AGP17 (ARABINO GALACTAN PROTEIN 17)
+2.03	0.00005604	0.00026252	249037_at	At5g44130	FLA13   FLA13 (FASCICLIN-LIKE ARABINO GALACTAN PROTEIN 13 PRECURSOR)
+2.03	0.00021907	0.00024551	266215_at	At2g06850	EXGT-A1   EXGT-A1 (ENDOXYLOGLUCCAN TRANSFERASE); hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
+2.03	0.00000561	0.00021587	262943_at	At1g79470	---   inosine-5-monophosphate dehydrogenase, putative similar to inosine-5-monophosphate dehydrogenase GI:307066 from [Homo sapiens];supported by full-length cDNA: Ceres:95749.
+2.03	0.00002883	0.00020430	246002_at	At5g20740	---   ripening-related protein - like grip28 ripening-related protein, Vitis vinifera, EMBL:VVI237985;supported by full-length cDNA: Ceres:1710.
+2.02	0.00011070	0.00023007	252178_at	At3g50750	---   putative protein various predicted proteins
+2.02	0.00000325	0.00021236	248015_at	At5g56370	---   putative protein similar to unknown protein (emb CAB62440.1)
+2.01	0.00466501	0.00037913	261221_at	At1g19960	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm
+2.01	0.00454743	0.00034844	248888_at	At5g46240	KAT1   KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1); cyclic nucleotide binding / inward rectifier potassium channel
+2.01	0.00008706	0.00029303	266447_at	At2g43290	MSS3   MSS3 (multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast 3); calcium ion binding
+2.01	0.00002317	0.00026550	264872_at	At1g24260	SEP3   SEP3 (SEPALLATA3); DNA binding / protein binding / transcription factor
+2.01	0.00071944	0.00023306	247324_at	At5g64190	---   putative protein strong similarity to unknown protein (gb AAD25673.1)
+2.00	0.00737677	0.00067304	248968_at	At5g45280	---   pectin acetylerase ;supported by full-length cDNA: Ceres:39005.
+2.00	0.00005292	0.00030373	248169_at	At5g54610	ANK   ANK (ankyrin); protein binding
+2.00	0.00016663	0.00030250	262001_at	At1g33790	---   myrosinase binding protein, putative similar to myrosinase binding protein GB:BAA82151 GI:5360792 from

ANEXO 1

					[Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_15809813_gb_AY054174.1_
+2.00	0.00008298	0.00029899	258252_at	At3g15720	---   putative polygalacturonase similar to polygalacturonase GB:BAA88472 [Cucumis sativus]; supported by full-length cDNA: Ceres:6.
+2.00	0.00010534	0.00029040	247602_at	At5g60900	RLK1   RLK1 (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1); ATP binding / carbohydrate binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein tyrosine kinase/ sugar binding
+2.00	0.00000752	0.00028601	267467_at	At2g30580	DRIP2   DRIP2 (DREB2A-INTERACTING PROTEIN 2); protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding
+2.00	0.00003896	0.00026339	263264_at	At2g38810	HTA8   HTA8 (HISTONE H2A 8); DNA binding
+2.00	0.00001846	0.00023621	257507_at	At1g29600	---   zinc finger protein, putative similar to GI:4928919 from [Arabidopsis thaliana]
-2.00	0.00005767	0.00007944	254791_at	At4g12910	scpl20   scpl20 (serine carboxypeptidase-like 20); serine-type carboxypeptidase
-2.01	0.00135766	0.00017975	264953_at	At1g77120	ADH1   ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1); alcohol dehydrogenase
-2.01	0.00002213	0.00007769	245749_at	At1g51090	---   proline-rich protein, putative similar to proline-rich protein GI:3242079 from [Capsicum annuum]; supported by cDNA: gi_14334847_gb_AY035097.1_
-2.02	0.00006405	0.00012433	262882_at	At1g64900	CYP89A2   CYP89A2 (CYTOCHROME P450 89A2); electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.02	0.00001803	0.00007698	262881_at	At1g64890	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_15028136_gb_AY046018.1_
-2.02	0.00001037	0.00007102	254485_at	At4g20760	---   cell-cell signaling protein csgA - like cell-cell signaling protein csgA, Synechocystis sp., PIR2:S77176
-2.03	0.09097751	0.00108303	266167_at	At2g38860	YLS5   YLS5
-2.03	0.00052576	0.00017869	254907_at	At4g11190	---   putative disease resistance response protein disease resistance response protein 206-d - Pisum sativum, PID:g508844
-2.03	0.00002866	0.00006050	263954_at	At2g35840	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_15450787_gb_AY054474.1_
-2.04	0.00022162	0.00014415	265499_at	At2g15480	UGT73B5   UGT73B5 (UDP-glucosyl transferase 73B5); UDP-glucosyltransferase/ UDP-glycosyltransferase/ quercetin 3-O-glucosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups
-2.04	0.00166884	0.00012398	255585_at	At4g01550	anac069   anac069 (Arabidopsis NAC domain containing protein 69); transcription factor
-2.05	0.01027178	0.00025901	244933_at	ndhE	---   NADH dehydrogenase ND4L
-2.05	0.00002360	0.00007418	260546_at	At2g43520	ATTI2   ATTI2; serine-type endopeptidase inhibitor
-2.06	0.02982516	0.00069531	261242_at	At1g32960	SBT3.3   SBT3.3; identical protein binding / serine-type endopeptidase
-2.06	0.18269411	0.00067707	260560_at	At2g43590	---   putative endochitinase
-2.06	0.00377332	0.00014801	244934_at	ndhG	---   NADH dehydrogenase ND6
-2.06	0.00082869	0.00007663	248820_at	At5g47060	---   putative protein similar to unknown protein (pir) F71446)
-2.06	0.00002161	0.00006804	263542_at	At2g21630	---   putative protein transport protein SEC23 similar to human SEC23
-2.06	0.00003561	0.00006699	245277_at	At4g15550	IAGLU   IAGLU (INDOLE-3-ACETATE BETA-D-GLUCOSYLTRANSFERASE); UDP-glycosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups
-2.06	0.00029185	0.00006068	261431_at	At1g18710	AtMYB47   AtMYB47 (myb domain protein 47); DNA binding / transcription factor
-2.07	0.05023454	0.00059781	250798_at	At5g05340	---   peroxidase
-2.07	0.01010906	0.00039702	254408_at	At4g21390	B120   B120; ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ sugar binding



-2.07	0.00245891	0.00015414	244939_at	rps12.1	---   ribosomal protein S12 (trans-splice part 1 of 2)
-2.07	0.00003864	0.00007190	246786_at	At5g27410	---   putative amino acid aminotransferase branched-chain amino acid aminotransferase - Pseudomonas aeruginosa, SWISSPROT:ILVE_PSEAE; supported by cDNA: gi_13605848_gb_AF367323.1_AF367323
-2.08	0.03934842	0.00068181	261474_at	At1g14540	---   anionic peroxidase, putative similar to anionic peroxidase GI:170202 from [Nicotiana glauca]
-2.08	0.00089200	0.00006804	265817_at	At2g18050	HIS1-3   HIS1-3 (HISTONE H1-3); DNA binding / nucleosomal DNA binding
-2.09	0.00271944	0.00019974	264280_at	At1g61820	BGLU46   BGLU46 (BETA GLUCOSIDASE 46); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
-2.10	0.00070376	0.00012679	264091_at	At1g79110	---   hypothetical protein predicted by genscan+;supported by full-length cDNA: Ceres:36412.
-2.10	0.00040713	0.00005699	256096_at	At1g13650	---   unknown protein
-2.11	0.02087943	0.00046804	257206_at	At3g16530	---   putative lectin similar to lectin SP:P02874 [Onobrychis viciifolia]; contains Pfam profile: PF00139 legume lectins beta domain; supported by cDNA: gi_15809853_gb_AY054194.1
-2.11	0.00102832	0.00008207	245422_at	At4g17470	---   putative protein
-2.11	0.00007411	0.00007576	256299_at	At1g69530	ATEXPA1   ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1)
-2.13	0.10453208	0.00158562	266712_at	At2g46750	---   unknown protein
-2.13	0.00056991	0.00011434	244912_at	ccb382	---   cytochrome c biogenesis orf382 Protein sequence is in conflict with the conceptual translation
-2.14	0.00002895	0.00006436	245987_at	At5g13180	ANAC083   ANAC083 (ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 83); transcription factor
-2.15	0.02617807	0.00035072	253046_at	At4g37370	CYP81D8   CYP81D8; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.16	0.00004004	0.00004805	248311_at	At5g52570	BETA-OHASE 2   BETA-OHASE 2 (BETA-CAROTENE HYDROXYLASE 2); carotene beta-ring hydroxylase
-2.16	0.00000157	0.00003718	247668_at	At5g60100	APRR3   APRR3 (ARABIDOPSIS PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 3); transcription regulator/ two-component response regulator
-2.17	0.09184052	0.00084489	249812_at	At5g23830	---   putative protein similar to unknown protein (pir T00970);supported by full-length cDNA: Ceres:13418.
-2.17	0.00448521	0.00006681	252965_at	At4g38860	---   putative auxin-induced protein auxin-induced protein 10A, Glycine max., PIR2:JQ1099
-2.17	0.00004032	0.00003858	245017_at	psal	---   PSI I protein
-2.19	0.00000484	0.00004735	247704_at	At5g59515	RTFL5   RTFL5 (ROTUNDIFOLIA LIKE 5)
-2.20	0.00820301	0.00011854	244932_at	psaC	---   PSI 9KDa protein
-2.20	0.00140797	0.00009645	262640_at	At1g62763	---   hypothetical protein
-2.20	0.00076959	0.00009382	249942_at	At5g22300	GAPB   GAPB (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE B SUBUNIT); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+)/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
-2.22	0.01576761	0.00023288	260408_at	At1g69880	ATH8   ATH8 (thioredoxin H-type 8)
-2.22	0.00032250	0.00006295	266516_at	At2g47880	---   putative glutaredoxin ;supported by full-length cDNA: Ceres:21006.
-2.22	0.00007758	0.00004314	248337_at	At5g52310	LTI78   LTI78 (LOW-TEMPERATURE-INDUCED 78)
-2.23	0.18181124	0.00106778	257061_at	At3g18250	---   hypothetical protein predicted by genscan+
-2.23	0.00000596	0.00003034	262164_at	At1g78070	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_13937194_gb_AF372951.1_AF372951
-2.25	0.01356911	0.00023341	255259_at	At4g05020	NDB2   NDB2 (NAD(P)H dehydrogenase B2); FAD binding / disulfide oxidoreductase/ oxidoreductase
-2.25	0.00396236	0.00012696	251176_at	At3g63380	---   Ca <sup>2+</sup> -transporting ATPase -like protein Ca <sup>2+</sup> -transporting ATPase, calmodulin-stimulated, wild cabbage, PIR:T14453

## ANEXO 1

-2.25	0.00084615	0.00006962	266270_at	At2g29470	ATGSTU3   ATGSTU3 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 3); glutathione transferase
-2.25	0.00007898	0.00002578	266155_at	At1g64950	CYP89A5   CYP89A5; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.26	0.00038032	0.00004209	263161_at	At1g54020	---   myrosinase-associated protein, putative similar to myrosinase-associated protein GI:1769967 from [Brassica napus]; supported by cDNA: gj_15809979_gb_AY054258.1
-2.26	0.00026545	0.00002613	265053_at	At1g52000	---   myrosinase binding protein, putative similar to myrosinase binding protein GI:1711295 from [Brassica napus]
-2.26	0.00002028	0.00002508	267063_at	At2g41120	---   hypothetical protein predicted by genefinder
-2.26	0.00000133	0.00002245	248538_at	At5g50110	---   putative protein contains similarity to glucose inhibited division protein B;supported by full-length cDNA: Ceres:97340.
-2.29	0.08787750	0.00080140	262119_s_at	At1g02930	ATGSTF6   ATGSTF6 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE); copper ion binding / glutathione binding / glutathione transferase
-2.29	0.00016272	0.00002157	257017_at	At3g19620	---   beta-xylosidase, putative similar to beta-xylosidase A GB:BAA28267 from [Aspergillus oryzae]
-2.31	0.00190682	0.00006979	253060_at	At4g37710	---   putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:207350.
-2.31	0.00001152	0.00002701	260203_at	At1g52890	ANAC019   ANAC019 (Arabidopsis NAC domain containing protein 19); transcription factor
-2.32	0.01901660	0.00025235	258586_s_at	At3g04320	---   putative trypsin inhibitor similar to trypsin inhibitor:ISOTYPE=a GB:737210; contains Pfam profile: PF00197 trypsin and protease inhibitors
-2.32	0.00009180	0.00002595	255437_at	At4g03060	AOP2   AOP2 (ALKENYL HYDROXALKYL PRODUCING 2); oxidoreductase, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors
-2.32	0.00022733	0.00002508	247959_at	At5g57080	---   unknown protein
-2.32	0.00000188	0.00002157	247351_at	At5g63790	ANAC102   ANAC102 (ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102); transcription factor
-2.32	0.00000078	0.00001771	250129_at	At5g16450	---   S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase-like protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 13819.
-2.34	0.00033880	0.00003981	264299_s_at	At1g78860	---   hypothetical protein predicted by genemark.hmm
-2.34	0.00012693	0.00003034	265917_at	At2g15080	AtRLP19   AtRLP19 (Receptor Like Protein 19); kinase/ protein binding
-2.34	0.00001819	0.00002508	246418_at	At5g16960	---   quinone oxidoreductase -like protein probable quinone oxidoreductase (EC 1.6.5.5) P1, Arabidopsis thaliana, PIR:S57611;supported by full-length cDNA: Ceres:7898.
-2.35	0.00093210	0.00005278	245463_at	At4g17030	ATEXLB1   ATEXLB1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE B1)
-2.35	0.00001525	0.00001508	245930_at	At5g09240	---   transcriptional co-activator-like protein putative transcriptional co-activator (KIWI) - Arabidopsis thaliana, EMBL:AF053302
-2.36	0.00009358	0.00002613	263539_at	At2g24850	TAT3   TAT3 (TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3); L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase/ transaminase
-2.37	0.00000249	0.00001473	252487_at	At3g46660	UGT76E12   UGT76E12 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 76E12); UDP-glycosyltransferase/ quercetin 3-O-glucosyltransferase/ quercetin 7-O-glucosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups
-2.37	0.00000291	0.00001333	246155_at	At5g20030	---   putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:142064.
-2.38	0.00008584	0.00002841	265197_at	At2g36750	UGT73C1   UGT73C1 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 73C1); UDP-glycosyltransferase/ UDP-glycosyltransferase/ cis-zeatin O-beta-D-glucosyltransferase/ trans-zeatin O-beta-D-glucosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups
-2.39	0.02187029	0.00020833	254215_at	At4g23700	ATCHX17   ATCHX17 (CATION/H+ EXCHANGER 17); monovalent cation:proton antiporter/ sodium:hydrogen

					antiporter
-2.39	0.00002154	0.00001350	253175_at	At4g35050	MSI3   MSI3 (MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 3); protein binding
-2.42	0.08426065	0.00021201	260225_at	At1g74590	GSTU10   GSTU10 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 10); glutathione transferase
-2.42	0.02879082	0.00019290	249454_at	At5g39520	---   expressed protein predicted protein, <i>Synechocystis</i> sp., PIR:S77152; supported by full-length cDNA: Ceres:5331.
-2.44	0.00357175	0.00006313	256321_at	At1g55020	LOX1   LOX1; lipoxygenase
-2.45	0.00027657	0.00003121	266536_at	At2g16900	---   hypothetical protein predicted by genefinder; supported by cDNA: gi_14532491_gb_AY039870.1
-2.47	0.00598563	0.00007698	249333_at	At5g40990	GLIP1   GLIP1 (GDSL LIPASE1); carboxylesterase/ lipase
-2.47	0.00010967	0.00001017	257008_at	At3g14210	ESM1   ESM1 (epithiospecifier modifier 1); carboxylesterase/ hydrolase, acting on ester bonds
-2.51	0.00050024	0.00003104	260602_at	At1g55920	ATSERAT2;1   ATSERAT2;1 (SERINE ACETYLTRANSFERASE 2;1); serine O-acetyltransferase
-2.52	0.00822890	0.00008470	252908_at	At4g39670	---   putative protein
-2.52	0.00000207	0.00000807	261266_at	At1g26770	ATEXPA10   ATEXPA10 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A 10); structural constituent of cell wall
-2.54	0.02185239	0.00013205	262229_at	At1g68620	---   unknown protein ; supported by cDNA: gi_14335125_gb_AY037242.1
-2.54	0.00000029	0.00000737	249732_at	At5g24420	---   6-phosphogluconolactonase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:13806.
-2.58	0.00031196	0.00002157	253268_s_at	At4g34135	UGT73B2   UGT73B2 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 73B2); UDP-glucosyltransferase/ UDP-glycosyltransferase/ flavonol 3-O-glucosyltransferase/ quercetin 7-O-glucosyltransferase
-2.58	0.00035151	0.00001350	245016_at	accD	---   carboxytransferase beta subunit
-2.59	0.01244624	0.00008523	265260_at	At2g43000	anac042   anac042 (Arabidopsis NAC domain containing protein 42); transcription factor
-2.60	0.00052113	0.00002508	255543_at	At4g01870	---   predicted protein of unknown function similar to bacterial tolB proteins but unclear if T7B11.13 is involved in viral transport
-2.61	0.00057492	0.00001613	261475_at	At1g14550	---   anionic peroxidase, putative similar to anionic peroxidase Gl:170202 from [ <i>Nicotiana sylvestris</i> ]
-2.61	0.00000024	0.00000421	265200_s_at	At2g36790	UGT73C6   UGT73C6 (UDP-glucosyl transferase 73C6); UDP-glucosyltransferase/ UDP-glycosyltransferase/ quercetin 3-O-glucosyltransferase/ quercetin 4-O-glucosyltransferase/ quercetin 7-O-glucosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups
-2.69	0.13518149	0.00091381	258957_at	At3g01420	DOX1   DOX1; lipoxygenase
-2.69	0.05405804	0.00010715	260101_at	At1g73260	---   putative trypsin inhibitor similar to trypsin inhibitor propeptide GB:AAB68964 [ <i>Brassica oleracea</i> ]; contains Pfam profile: PF00197 Trypsin and protease inhibitors; supported by cDNA: gi_15450971_gb_AY054566.1
-2.69	0.00000051	0.00000421	259705_at	At1g77450	anac032   anac032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32); transcription factor
-2.71	0.00013358	0.00000982	250252_at	At5g13750	ZIFL1   ZIFL1 (ZINC INDUCED FACILITATOR-like 1); tetracycline:hydrogen antiporter
-2.74	0.00925039	0.00006015	266292_at	At2g29350	SAG13   SAG13; alcohol dehydrogenase/ oxidoreductase
-2.76	0.00033339	0.00000701	253503_at	At4g31950	CYP82C3   CYP82C3; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.77	0.00004137	0.00000403	267425_at	At2g34810	---   putative berberine bridge enzyme
-2.82	0.00000015	0.00000298	245292_at	At4g15093	---   Expressed protein ; supported by cDNA: gi_15293028_gb_AY050948.1
-2.84	0.00043411	0.00000929	266290_at	At2g29490	ATGSTU1   ATGSTU1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 1); glutathione transferase
-2.85	0.10766817	0.00015046	260568_at	At2g43570	---   endochitinase isolog
-2.86	0.00003585	0.00000386	263031_at	At1g24070	ATCSLA10   ATCSLA10; cellulose synthase/ transferase, transferring glycosyl groups

## ANEXO 1

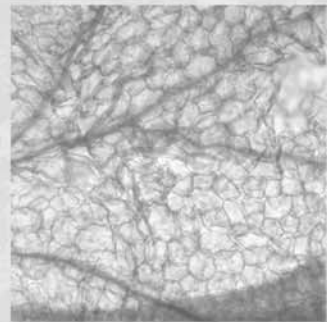
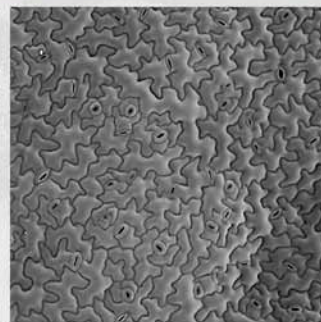
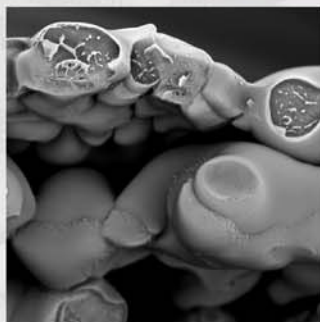
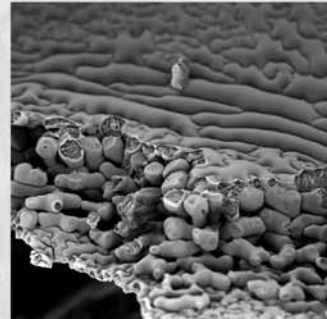
-2.87	0.00443262	0.00002315	245976_at	At5g13080	WRKY75   WRKY75; transcription factor
-2.89	0.00689785	0.00003367	258100_at	At3g23550	---   unknown protein
-2.89	0.00000406	0.00000281	264514_at	At1g09500	---   putative cinnamyl alcohol dehydrogenase similar to cinnamyl alcohol dehydrogenase, gi 1143445; supported by cDNA: gi_15983385_gb_AF424567.1_AF424567
-2.90	0.00008978	0.00000403	263210_at	At1g10585	---   Expressed protein ; supported by cDNA: gi_15293050_gb_AY050959.1
-2.90	0.00006119	0.00000281	263184_at	At1g05560	UGT75B1 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 75B1); UDP-glucose:4-aminobenzoate acylglucosyltransferase/UDP-glucosyltransferase/ UDP-glycosyltransferase/ abscisic acid glucosyltransferase/ transferase, transferring glycosyl groups
-2.90	0.00000039	0.00000263	256603_at	At3g28270	unknown protein similar to At14a protein GB:AAD26355 GI:4589123 [Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_16226582_gb_AF428437.1_AF428437
-2.91	0.00652660	0.00002929	252827_at	At4g39950	CYP79B2   CYP79B2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.94	0.00973773	0.00002911	265221_s_at	At2g02010	GAD3   GAD3 (glutamate decarboxylase 3); calmodulin binding
-2.94	0.00009830	0.00000298	255554_at	At4g01895	---   Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 28726.
-2.97	0.00001842	0.00000263	246888_at	At5g26270	---   putative protein
-2.98	0.12908279	0.00006681	254889_at	At4g11650	ATOSM34   ATOSM34 (osmotin 34)
-3.05	0.07262053	0.00009680	256933_at	At3g22600	---   unknown protein contains Pfam profile:PF00279 LTP:Plant lipid transfer protein family;supported by full-length cDNA: Ceres:19287.
-3.13	0.00133664	0.00000403	260261_at	At1g68450	---   unknown protein
-3.18	0.00694598	0.00001648	261394_at	At1g79680	---   wall-associated kinase 2, putative similar to wall-associated kinase 2 GI:4826399 from [Arabidopsis thaliana]
-3.20	0.01611552	0.00002438	245193_at	At1g67810	SUFE2   SUFE2 (SULFUR E 2); enzyme activator
-3.21	0.23808001	0.00002139	249052_at	At5g44420	PDF1.2   PDF1.2
-3.23	0.00002244	0.00000123	255795_at	At2g33380	RD20   RD20 (RESPONSIVE TO DESSICATION 20); calcium ion binding
-3.29	0.00100404	0.00000298	266267_at	At2g29460	ATGSTU4   ATGSTU4 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 4); glutathione transferase
-3.42	0.03144286	0.00002420	249481_at	At5g38900	---   frnE protein - like frnE protein, Deinococcus radiodurans, PIR:E75491;supported by full-length cDNA: Ceres:10982.
-3.44	0.01701801	0.00002753	247215_at	At5g64905	PROPEP3   PROPEP3 (Elicitor peptide 3 precursor)
-3.44	0.00005105	0.00000123	248607_at	At5g49480	ATCP1   ATCP1 (Ca <sup>2+</sup> -binding protein 1); calcium ion binding
-3.47	0.08664775	0.00003069	247573_at	At5g61160	AACT1   AACT1 (anthocyanin 5-aromatic acyltransferase 1); transferase/ transferase, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
-3.49	0.00218913	0.00000421	254385_s_at	At4g21830	ATMSRB7   methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / SelR domain-containing protein
-3.51	0.00784746	0.00000772	262518_at	At1g17170	ATGSTU24   ATGSTU24 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 24); glutathione binding / glutathione transferase
-3.52	0.00024074	0.00000123	260405_at	At1g69930	ATGSTU11   ATGSTU11 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 11); glutathione transferase
-3.61	0.00433271	0.00000544	255110_at	At4g08770	---   peroxidase C2 precursor like protein peroxidase (EC 1.11.1.7) C2 precursor - Armoracia rusticana,PID:d1014846
-3.68	0.01497000	0.00000649	263228_at	At1g30700	putative reticuline oxidase-like protein similar to GB:P30986 from [Eschscholzia californica] ( berberine bridge-

					forming enzyme ), ESTs gb F19886, gb Z30784 and gb Z30785 come from this gene; supported by cDNA: gi_16930506_gb_AF419607.1_AF419607
-3.73	0.00007842	0.00000105	259609_at	At1g52410	TSA1   TSA1 (TSK-ASSOCIATING PROTEIN 1); calcium ion binding / protein binding
-3.76	0.00209212	0.00000281	260406_at	At1g69920	ATGSTU12   ATGSTU12 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 12); glutathione transferase
-3.78	0.00000096	0.00000070	245628_at	At1g56650	PAP1   PAP1 (PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1); DNA binding / transcription factor
-4.13	0.00047644	0.00000070	264886_at	At1g61120	TPS04   TPS04 (TERPENE SYNTHASE 04); (E,E)-geranylinalool synthase
-4.14	0.00103961	0.00000105	267567_at	At2g30770	CYP71A13   CYP71A13 (cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 13); indoleacetaldoxime dehydratase/ oxygen binding
-4.15	0.00462436	0.00000158	252265_at	At3g49620	DIN11   DIN11 (DARK INDUCIBLE 11); iron ion binding / oxidoreductase
-4.19	0.00016600	0.00000070	260706_at	At1g32350	AOX1D   AOX1D (alternative oxidase 1D); alternative oxidase
-4.20	0.00088185	0.00000105	259033_at	At3g09410	---   putative pectinacylesterase similar to pectinacylesterase precursor GB:CAA67728 [Vigna radiata]
-4.24	0.00000006	0.00000053	256527_at	At1g66100	---   thionin, putative similar to thionin [Arabidopsis thaliana] GI:1181533; supported by cDNA: gi_14190504_gb_AF380652.1_AF380652
-4.25	0.01776672	0.00000281	267565_at	At2g30750	CYP71A12   CYP71A12 (cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 12); electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-4.27	0.00000046	0.00000053	248955_at	At5g45600	GAS41   GAS41; protein binding
-4.37	0.04099534	0.00000701	245393_at	At4g16260	---   beta-1,3-glucanase class I precursor ;supported by full-length cDNA: Ceres:3176.
-4.47	0.00241329	0.00000105	266995_at	At2g34500	CYP710A1   CYP710A1 (cytochrome P450, family 710, subfamily A, polypeptide 1); C-22 sterol desaturase/ oxygen binding
-4.57	0.00000014	0.00000053	256589_at	At3g28740	CYP81D1   CYP81D1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-4.79	0.00131222	0.00000070	250662_at	At5g07010	ST2A   ST2A (SULFOTRANSFERASE 2A); hydroxyjasmonate sulfotransferase/ sulfotransferase
-4.79	0.00000001	0.00000053	254928_at	At4g11410	---   putative protein hypothetical protein - Brassica napus,PIR2:S42651
-4.82	0.00007419	0.00000053	262099_s_at	At1g59500	GH3.4   GH3.4; indole-3-acetic acid amido synthetase
-4.84	0.00001562	0.00000053	264400_at	At1g61800	GPT2   GPT2; antiporter/ glucose-6-phosphate transmembrane transporter
-4.86	0.00000050	0.00000053	250598_at	At5g07690	ATMYB29   ATMYB29 (ARABIDOPSIS THALIANA MYB DOMAIN PROTEIN 29); DNA binding / transcription factor
-5.17	0.01379804	0.00000088	260015_at	At1g67980	CCOAMT   CCoAMT; caffeoyl-CoA O-methyltransferase
-5.17	0.00000250	0.00000035	267078_at	At2g40960	---   unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:2337.
-5.19	0.00000012	0.00000035	254066_at	At4g25480	DREB1A   DREB1A (DEHYDRATION RESPONSE ELEMENT B1A); DNA binding / transcription activator/ transcription factor
-5.41	0.00039933	0.00000035	251428_at	At3g60140	DIN2   DIN2 (DARK INDUCIBLE 2); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
-5.65	0.00000046	0.00000035	253545_at	At4g31310	---   AIG2-like protein AIG2 protein, Arabidopsis thaliana, PATCHX:G1127806
-5.67	0.00644187	0.00000053	245076_at	At2g23170	GH3.3   GH3.3; indole-3-acetic acid amido synthetase
-5.69	0.00000116	0.00000035	245928_s_at	At5g24780	VSP1   VSP1 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1); acid phosphatase/ transcription factor binding
-5.82	0.00004217	0.00000035	267147_at	At2g38240	---   putative anthocyanidin synthase ;supported by full-length cDNA: Ceres:256433.
-6.02	0.00000001	0.00000035	250815_s_at	At5g05060	---   putative protein similar to unknown protein (pir T00890); supported by cDNA: gi_14334521_gb_AY034952.1
-6.05	0.00118542	0.00000035	245148_at	At2g45220	---   putative pectinesterase ; supported by cDNA: gi_13605695_gb_AF361829.1_AF361829

## ANEXO 1

-6.06	0.01356735	0.00000053	261020_at	At1g26390	---   hypothetical protein similar to reticuline oxidase-like protein GB:CAB45850 GI:5262224 from [Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_15293132_gb_AY051000.1
-6.36	0.00000503	0.00000035	256940_at	At3g30720	QQS   QQS (QUA-QUINE STARCH)
-6.47	0.05379209	0.00000070	257365_x_at	At2g26020	PDF1.2b   PDF1.2b (plant defensin 1.2b)
-6.52	0.00181442	0.00000035	257636_at	At3g26200	CYP71B22   CYP71B22; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-6.66	0.00132439	0.00000035	258277_at	At3g26830	PAD3   PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3); dihydrocamalexin acid decarboxylase/ monooxygenase/ oxygen binding
-7.18	0.00000114	0.00000035	259640_at	At1g52400	BGLU18   BGLU18 (BETA GLUCOSIDASE 18); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
-7.38	0.01845349	0.00000035	261021_at	At1g26380	---   hypothetical protein similar to reticuline oxidase-like protein GB:CAB45850 GI:5262224 from [Arabidopsis thaliana]; supported by cDNA: gi_13430839_gb_AF360332.1_AF360332
-7.64	0.00190700	0.00000035	263948_at	At2g35980	YLS9   YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)
-7.67	0.00001472	0.00000000	265058_s_at	At1g52040	MBP2   MBP2 (MYROSINASE-BINDING PROTEIN 2); sugar binding / thioglucosidase binding
-7.69	0.00079723	0.00000035	256376_s_at	At1g66690	PXMT1   PXMT1; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase
-7.83	0.00000444	0.00000000	263231_at	At1g05680	---   putative indole-3-acetate beta-glucosyltransferase similar to indole-3-acetate beta-glucosyltransferase GB:AAD32293
-7.95	0.00000694	0.00000000	261763_at	At1g15520	PDR12   PDR12 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
-9.25	0.00000040	0.00000000	256577_at	At3g28220	---   unknown protein
-9.29	0.00000381	0.00000000	265572_at	At2g28210	ATACA2   ATACA2 (ALPHA CARBONIC ANHYDRASE 2); carbonate dehydratase/ zinc ion binding

## ANEXO 2







## CURRICULUM VITAE

### FORMACIÓN

- Diploma de Estudios Avanzados: “*Biología Vegetal: Aspectos Moleculares, Fisiológicos y Biotecnológicos*” (2008). Universidad Autónoma de Madrid.
- CURSO DE ADAPTACIÓN PEDAGÓGICA (2005). Instituto de Ciencias de la Educación de la Universidad Complutense.
- Licenciatura en Biología. Universidad de Jaén (1998-2004).

### PUBLICACIONES

**Jarillo J.A., Del Olmo I., Gómez-Zambrano A., Lázaro A., López-González L., Miguel E., Narro-Diego L., Sáez D., y Piñeiro M.** (2008). Photoperiodic control of flowering time. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6, 221-244.

**Lázaro A., Gómez-Zambrano A., López-González L., Piñeiro M. y Jarillo JA.** (2008). Mutations in the Arabidopsis SWC6 gene, encoding a component of the SWR1 chromatin remodelling complex, accelerate flowering time and alter leaf and flower development. *J Exp Bot.* 59(3), 653-666.

### CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

A. Lázaro, **A. Gómez-Zambrano**, L. López-Gonzalez, M. Piñeiro, J. A. Jarillo. Mutations in Arabidopsis homologs of proteins of the SWR1 complex accelerate flowering time. (Poster). 18th Internacional Conference on Arabidopsis. Beijing (China). Junio 2007.

**Gómez-Zambrano, A.**, Lázaro, A., López-González, L., Piñeiro, M. y Jarillo, J.A. Mutations in Arabidopsis homologs of proteins of the SWR1 complex accelerate flowering time. (Poster). 6 Plant Genomics European Meeting. Tenerife (España). Octubre 2007.

A. Lázaro, **A. Gómez-Zambrano**, L. López-Gonzalez, M. Piñeiro, J. A. Jarillo. Mutations in Arabidopsis homologs of proteins of the SWR1 complex accelerate flowering time and alter leaf and flower development. (Poster). Chromatin at the nexus of cell division and differentiation. (Cantoblanco Workshops on Biology). Madrid (España). Junio/Julio 2008.

Pineiro, M., Del Olmo, I., **Gómez-Zambrano, A.**, Lazaro, A., López-Gonzalez, L, Narro-

Diego, L. y Jarillo, J.A. Chromatin remodeling and repression of flowering in Arabidopsis. (Comunicación oral). I European Workshop on Plant chromatin. Zurich (Suiza). Septiembre 2009.

**Gómez-Zambrano, A.**, Pineiro, M., y Jarillo, J.A. Characterization of Arabidopsis homologues for the SWC4 and YAF9 subunits of the SWR1 Chromatin remodeling complex. (Comunicación oral). II European Workshop on Plant chromatin. Versailles (Francia). Septiembre 2011.

**Gómez-Zambrano, A.**, Jurado-Sánchez, S., Pineiro, M., y Jarillo, J.A. Characterization of Arabidopsis homologues for the SWC4 and YAF9 subunits of the SWR1 Chromatin remodeling complex. (Poster). XI Reunión de Biología Molecular de Plantas 2012. Segovia (España). Junio 2012.

RESEARCH PAPER

# Mutations in the *Arabidopsis* *SWC6* gene, encoding a component of the SWR1 chromatin remodelling complex, accelerate flowering time and alter leaf and flower development

Ana Lázaro\*, Ángeles Gómez-Zambrano\*, Leticia López-González, Manuel Piñeiro and Jose A. Jarillo<sup>†</sup>

Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria-Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (INIA-UAU), Ctra. de A Coruña, Km 7,5, Madrid 28040, Spain

Received 31 October 2007; Revised 24 November 2007; Accepted 28 November 2007

## Abstract

Mutations affecting the *Arabidopsis* *SWC6* gene encoding a putative orthologue of a component of the SWR1 chromatin remodelling complex in plants have been characterized. *swc6* mutations cause early flowering, shortened inflorescence internodes, and altered leaf and flower development. These phenotypic defects resemble those of the *photoperiod independent early flowering 1* (*pie1*) and *early in short days 1* (*esd1*) mutants, also affected in homologues of the SWR1 complex subunits. SWC6 is a ubiquitously expressed nuclear HIT-Zn finger-containing protein, with the highest levels found in pollen. Double mutant analyses suggest that *swc6* abolishes the *FLC*-mediated late-flowering phenotype of plants carrying active alleles of *FRI* and of mutants of the autonomous pathway. It was found that SWC6 is required for the expression of the *FLC* repressor to levels that inhibit flowering. However, the effect of *swc6* in an *flc* null background and the down-regulation of other *FLC*-like/*MAF* genes in *swc6* mutants suggest that flowering inhibition mediated by SWC6 occurs through both *FLC*- and *FLC*-like gene-dependent pathways. Both genetic and physical interactions between SWC6 and ESD1 have been demonstrated, suggesting that both proteins act in the same complex. Using chromatin immunoprecipitation, it has been determined that SWC6, as previously shown for ESD1, is required for both histone H3 acetylation and H3K4 trimethylation of the *FLC* chromatin. Altogether, these results suggest that SWC6 and ESD1 are part of an *Arabidopsis* SWR1

chromatin remodelling complex involved in the regulation of diverse aspects of plant development, including floral repression through the activation of *FLC* and *FLC*-like genes.

Key words: *Arabidopsis*, chromatin remodelling, floral repression, HIT-Zn finger, phase transition, SWR1 complex.

## Introduction

To ensure that flowering occurs in optimal conditions, plants integrate both environmental and endogenous signals before switching to reproductive development. To select the right season for flowering, plants rely fundamentally on environmental factors such as light and temperature that suffer predictable changes through the year. *Arabidopsis thaliana* is a facultative long-day (LD) species in which winter and summer annual accessions can be distinguished. In winter annual accessions, flowering time is regulated by the vernalization, photoperiod, and gibberellin (GA) pathways (Baurle and Dean, 2006; Imaizumi and Kay, 2006; Schmitz and Amasino, 2007). The photoperiod pathway promotes flowering in response to LD through the activation of the floral integrators *FT* and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1* (*SOCI*). Indeed, FT protein has been recently proposed as an essential component of the systemic signal that mediates photoperiodic induction of flowering (Corbesier *et al.*, 2007). The GA pathway is required for flowering in non-inductive photoperiods, and mutants with reduced

\* These authors contributed equally to this work.

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: jarillo@inia.es

GA levels are extremely delayed in flowering time under short days (SD) (Wilson *et al.*, 1992). In addition, winter annuals require exposure to an extended period of cold (vernalization) to become flowering competent, thus preventing premature flowering in the autumn (Michaels and Amasino, 2000; Sung and Amasino, 2006). This requirement is mainly conferred by dominant alleles at the *FRIGIDA* (*FRI*) (Johanson *et al.*, 2000) and *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) loci (Michaels and Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999), as well as by other *FLC*-related genes within the *MAF* clade (Scortecci *et al.*, 2001; Ratcliffe *et al.*, 2003; Werner *et al.*, 2005). Active alleles of *FRI* increase *FLC* expression to levels that delay flowering (Michaels and Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999). *FLC* suppresses the expression of *FT* and *SOC1* genes, which function as integrators of flowering signals; therefore, *FLC* confers a flowering response to vernalization in *Arabidopsis* by repressing both the generation of flowering-inductive systemic signals and the meristem competence to respond to such signals (Searle *et al.*, 2006). Vernalization promotes flowering by overcoming the effect of *FRI* and repressing *FLC* expression; this repression is stably maintained after plants are returned to warm growth conditions, allowing them to flower (Michaels and Amasino, 1999; Sheldon *et al.*, 1999).

Many summer annual accessions of *Arabidopsis* lack an active *FRI* allele (Johanson *et al.*, 2000; Gazzani *et al.*, 2003; Shindo *et al.*, 2005). Under these circumstances, *FLC* expression is low and flowering occurs rapidly without vernalization. In these accessions, the reduction of *FLC* expression depends on the function of the autonomous pathway (Michaels and Amasino, 2001). In fact, mutations in autonomous pathway genes cause a flowering delay under any photoperiod (Boss *et al.*, 2004) that is associated with higher *FLC* expression, and can be rescued by vernalization (Michaels and Amasino, 1999, 2001; Sheldon *et al.*, 1999). Several genes have been classically ascribed to the autonomous pathway, including either factors involved in the binding and processing of mRNAs or proteins associated with chromatin remodelling processes (for reviews see Baurle and Dean, 2006; Schmitz and Amasino, 2007). *FVE* and *FLOWERING LOCUS D* (*FLD*) belong to the last group. The homologue of *FVE* in animals is found in nucleosome Remodelling Factor (NuRF) and histone deacetylase (HDAC) complexes and is likely to act as a histone chaperone (Ausin *et al.*, 2004). *FLD* and related proteins, such as *swp1*, are highly homologous to human KIAA0601/lysine demethylase 1 (LSD1) (He *et al.*, 2003; Krichevsky *et al.*, 2007), also present in HDAC complexes (Lee *et al.*, 2006). Consistent with the nature of these proteins, the increased expression of *FLC* in *fve*, *fld*, and *swp1* mutants is correlated with hyperacetylation of histones H3 and H4 (He *et al.*, 2003; Ausin *et al.*, 2004; Krichevsky *et al.*, 2007), a modification associated with transcriptionally active chromatin conformations.

During vernalization, histone modifications associated with active genes such as acetylation of histone H3 and H4 and methylation at H3K4 decrease in *FLC* chromatin but the level of repressive markers such as H3K9 and H3K27 trimethylation increase (Sung and Amasino, 2004; Sung *et al.*, 2006). This vernalization-dependent repressed state of *FLC* is mitotically stable; upon passing to the next generation, *FLC* expression is reset to the active state, suggesting the involvement of a mechanism conferring cellular memory for remembering winter. VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3) appears to be required for histone deacetylation in the *FLC* region following vernalization (Sung and Amasino, 2004) and none of the repressive markers associated with vernalization is present in *vin3* mutants. A polycomb group (PcG) complex containing VERNALIZATION 2 (VRN2) and VIN3 may bring histone deacetylase and histone methyltransferase activities together at *FLC* chromatin, providing a coordinated mechanism for the epigenetic modifications associated with the vernalization-mediated repression of the *FLC* gene (Wood *et al.*, 2006).

The establishment of the winter-annual habit of *Arabidopsis* requires that *FLC* is expressed at high levels in the first growing season to block flowering before winter. High levels of acetylation of histone H3 and H4 and H3K4 methylation contribute to an active chromatin conformation at the *FLC* locus during initial stages of development (He *et al.*, 2004; Sung and Amasino, 2004; Kim *et al.*, 2005; Martin-Trillo *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2006). The isolation of mutants capable of flowering early in winter-annual backgrounds has led to the identification of genes required to activate *FLC* at the beginning of the life cycle and that encode components of putative chromatin remodelling complexes. Most of these mutants can be classified into two different groups, affecting putative orthologues of either the SWR1 or the PAF1 complexes. Mutations in genes encoding proteins related to components of the yeast transcriptional-activating PAF1 complex [*early flowering 7* (*elf7*), *elf8*, and *vernalization independent 4* (*vip4*)] (He *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2004) cause an acceleration of flowering. In yeasts, this complex interacts with SET1 and SET2 histone methyltransferases involved in methylation of H3K4 and H3K36, respectively (Krogan *et al.*, 2003). Mutants in the *Arabidopsis* histone methyltransferase *EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS* (*EFS/SDG8*) also flower early and display reduced levels of *FLC* expression, like PAF1 complex mutants (Kim *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005), suggesting that the PAF1 complex and *EFS* may act directly on *FLC* to maintain high levels of expression. Consistent with this, two different studies have provided evidence that this protein is required for high levels of either H3K4me3 or H3K36me2 in the region of *FLC* (Kim *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005).

In the same way, mutations in putative orthologues of the yeast SWR1 complex, including *EARLY IN SHORT*

DAYS 1/SUPPRESSOR OF FRIGIDA 3/ACTIN RELATED PROTEIN 6 (ESD1/SUF3/ARP6) (Choi *et al.*, 2005; Deal *et al.*, 2005; Martin-Trillo *et al.*, 2006), the SWI/SNF ATPase PHOTOPERIOD INDEPENDENCE1 (PIE1) (Noh *et al.*, 2003), and SEF (SERRATED AND EARLY FLOWERING)/AtSWC6 (Choi *et al.*, 2007; March-Diaz *et al.*, 2007) have been described recently. The SWR1 complex in yeast catalyses the replacement of nucleosomal H2A with the H2A.Z variant, ensuring full activation of underlying genes. Recently H2A.Z was identified within *FLC* and *FLC-like* chromatin (Deal *et al.*, 2007). Loss of H2A.Z from *FLC* chromatin in *esd1/suf3/arp6* and *pie1* mutants results in reduced *FLC* expression and premature flowering, indicating that this histone variant is required for a high level of expression of *FLC* (Deal *et al.*, 2007). In addition, H2A.Z interacts with both PIE1 and AtSWC2, and knockdown of the H2A.Z genes by RNA interference or artificial microRNA caused a phenotype similar to that of *esd1/suf3/arp6* (Choi *et al.*, 2007). These observations support the existence of a SWR1-like complex in plants that is targeted to different loci including *FLC*, and show that H2A.Z can enhance transcriptional activation in plants. The fact that H2A.Z remains associated with chromatin throughout mitosis suggests that it may serve as an epigenetic memory function by marking active genes and poisoning silenced genes for reactivation (Deal *et al.*, 2007).

This work reports the characterization of *SWC6*, a putative component of the SWR1 complex of *Arabidopsis*, required for the maintenance of *FLC* expression. *swc6*, like mutations in other putative components of this complex, causes early flowering mainly through the reduction of *FLC* expression, although it also appears to affect flowering through other *FLC*-like repressors. It is demonstrated here that *SWC6* interacts both genetically and physically with another crucial subunit of the complex such as ESD1/SUF3/ARP6 and that both proteins are needed to achieve the levels of both H3 acetylation and H3K4me3 required for high *FLC* expression. Taken together, the data indicate that *SWC6* and ESD1/SUF3/ARP6 might form a molecular complex in *Arabidopsis* related to the SWR1/SRCAP complex identified in other eukaryotes, which regulates diverse aspects of plant development, including floral repression.

## Materials and methods

### Genetic stocks and growth conditions

Mutant seed stocks used were in the Columbia (Col) genetic background, and were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) of Ohio State University (Columbus, USA) and personal donations. The *five-3* mutant was described by Ausin *et al.* (2004); *flc-3* was described by Michaels and Amasino (2001); *esd1-10* was described by Martin-Trillo *et al.* (2006); the Col *FRI-Sf2* lines were described by Lee and Amasino (1995). The

origin of the *swc6-1* and *swc6-2* alleles is described in the text. The same alleles were identified previously and denoted as *sef-2* and *sef-1*, respectively (March-Diaz *et al.*, 2007). *swc6-1* and *swc6-2* mutations were confirmed to be allelic by their failure to complement the early flowering phenotype in F<sub>1</sub> plants derived from crosses between them. Plants were grown in plastic pots containing a mixture of substrate and vermiculite (3:1). Controlled environmental conditions were provided in growth chambers at 21 °C and 80% relative humidity. Plants were illuminated with cool-white fluorescent lights (~120 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). LD conditions consisted of 16 h of light followed by 8 h of darkness; SD conditions consisted of 8 h of light followed by 16 h of darkness.

### Phenotypic analyses

Total leaf number was scored as the number of main leaves in the rosette (excluding cotyledons) plus the number of leaves in the inflorescence at the time of opening of the first flower; for each experiment the average flowering time of at least 20 plants ± SE is error is given (Martin-Trillo *et al.*, 2006). Cauline, adult, and juvenile leaves were scored independently. Rosette leaves lacking abaxial trichomes were considered as juvenile leaves (Telfer *et al.*, 1997).

### Genetic analysis

Double mutants were generated by crossing the monogenic *swc6-1* mutant with lines carrying the *five-3* (Ausin *et al.*, 2004), *flc-3* (Michaels and Amasino, 2001), and *esd1-10* (Martin-Trillo *et al.*, 2006) mutations and with Col *FRI Sf-2* (Lee and Amasino, 1995). Double mutants were isolated from selfed F<sub>2</sub> progeny using molecular markers associated with each mutation.

### Molecular characterization of the *swc6* alleles

The T-DNA insertion *swc6-1* (SAIL\_1142\_C03) and *swc6-2* (SAIL\_536\_A05) mutant lines were obtained from NASC. Two specific primers or one specific primer and a T-DNA left border (LBA SAIL) primer were used for amplification of wild-type or T-DNA insertion alleles, respectively (LBA SAIL, 5'-TTCATAACCAATCTCGATACAC-3'). T-DNA borders were determined by sequencing PCR products obtained with T-DNA border primers and gene-specific primers.

### Generation of transgenic plants

Transgenic plants expressing *SWC6* and *ESD1/SUF3/ARP6* full-length cDNAs under the control of the 35S cauliflower mosaic virus promoter or expressing a promoter fragment of the *SWC6* gene fused to the *GUS* gene (353 bp upstream of the ATG) were generated following *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using the floral-dip method (Clough and Bent, 1998). The *Agrobacterium* strain used was C58C1. Transformant plants were selected on GM medium containing appropriate antibiotics. Levels of overexpressed genes were tested by northern blots using *SWC6*- and *ESD1/SUF3/ARP6*-specific probes. As loading controls, a 305 bp *EcoRI* fragment of the cauliflower 18S rDNA gene was used.

### Histochemical β-glucuronidase assays

*GUS* activity in *pSWC6:GUS* plants was revealed by incubation in 100 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7.2), 2.5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide, 0.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.5 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> and 0.25% Triton X-100. Plant tissue was incubated at 37 °C overnight. After staining, chlorophyll was cleared from the samples by dehydration through ethanol.



### Whole-mount anther preparation for microscopy

Anthers were collected and incubated overnight at 4 °C in coloration buffer, containing equal volumes of extraction buffer (0.1% Nonidet P40, 10% dimethyl sulphoxide, 5 mM EGTA, pH 7.5, 50 mM PIPES, pH 6.9) and DAPI solution (1 mg DAPI ml<sup>-1</sup> dimethyl sulphoxide).

### Yeast two-hybrid analysis

Yeast two-hybrid interaction analyses were conducted in the Y190 strain with the MatchMaker two-hybrid system (Clontech). pGBT-8 or pGAD plasmids were used for GBD or GAD fusion constructs, respectively. cDNAs for SWC6 and ESD1/SUF3/ARP6 were obtained by standard PCR techniques and cloned into the above-mentioned vectors using Gateway recombinant technologies (Clontech). Selection was performed on synthetic complete (SC) minimal medium without His, Leu, and Trp, supplemented with 5–25 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT).

### Protein expression, purification, and pull-down assays

The *SWC6* expression construct was prepared in the pGEX-6P-3 vector (Amersham Biosciences) and expressed in *Escherichia coli* BL21 Rosetta. Standard PCR techniques were used for GST tagging of SWC6. Proteins were purified on glutathione 4B Sepharose beads (GE Amersham) and kept on beads as GST–SWC6 or GST alone. *In vitro* transcription/translation ESD1/SUF3/ARP6 reactions were performed with the TNT Quick Coupled Transcription/Translation system (Promega) in the presence of [<sup>35</sup>S]methionine (Amersham Biosciences). For pull-down assays, 500 ng of GST or GST–SWC6 bound to beads were incubated in 200 µl of binding buffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.01% Nonidet P-40) with 15 µl of the TNT reaction and rinsed with binding buffer supplemented with 500 mM NaCl. Samples were boiled with Laemmli buffer and analysed by SDS–PAGE.

### Expression analysis

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen-Gibco). cDNA was prepared by reverse transcription of total RNA from *Arabidopsis* roots, stems, rosette and cauline leaves, floral buds, and flowers, according to described procedures (Martin-Trillo *et al.*, 2006). *SWC6* transcript levels were assayed by reverse transcription (RT)-PCR, with specific primers, 5'-ATGGAGGAAGAGATGTC-GAACC-3' and 5'-CGAGATCATCATCTTCATCAAGAG-3', designed to amplify the N-terminal end of the coding region. For the rest of genes analysed, such as *FLC*, the *MAF* family, *FT* RT-PCR and *SOC1* genes, was performed, according to described procedures (Scortecci *et al.*, 2001; Piñeiro *et al.*, 2003; Ratcliffe *et al.*, 2003; Martin-Trillo *et al.*, 2006). *UBIQUITIN 10 (UBQ10)* was used as the control in these experiments.

### Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays and PCR

ChIP assays were carried out as described (Ausin *et al.*, 2004). Chromatin proteins and DNA were cross-linked in 10-d-old Col, *esd1-10*, and *swc6-1* seedlings by formaldehyde fixation. After chromatin isolation, the H3 acetylated and methylated fractions were immunoprecipitated using specific antibodies; one of them recognizes both acetylated K9 and K14 residues, and the second one recognizes K4me3 residues (06-599 and 07-473 from Upstate Biotechnology, respectively). Cross-links were reversed by incubations at 65 °C for 2 h, and DNA was purified with QIAquick spin columns (QIAGEN) and eluted in 40 µl of TE (pH 8.0). Semi-quantitative PCR was used to amplify two different fragments of the *FLC* gene as described previously (Martin-Trillo *et al.*, 2006; details

and primer sequences are available on request). All PCR and quantification of the amplified DNA were done as described previously (Martin-Trillo *et al.*, 2006). Three independent experiments were carried out. *UBQ10* served as an internal control for the ChIP analysis. To calculate the fold decrease in H3 acetylation or methylation, *FLC* was first normalized to *UBQ10* in each sample, and, subsequently, these values were normalized against their respective wild-type controls.

Gene sequences described in this article can be found in GenBank under accession numbers NM\_123064 (*SWC6*) and NM\_114070 (*ESD1/SUF3/ARP6*).

## Results

### *swc6* mutants are early flowering and display pleiotropic defects in both vegetative and reproductive development

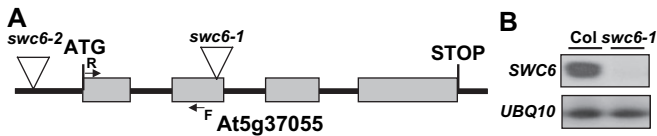
Previously, *esd1*, an *Arabidopsis* early flowering mutant affected in an orthologue of ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (ARP6), had been identified (Martin-Trillo *et al.*, 2006). The yeast ARP6 protein is a component of the SWR1 complex, which consists of 13 subunits including the ATPase component SWR1 and SWC6/VSP71 (Kobor *et al.*, 2004; Mizuguchi *et al.*, 2004). A physical interaction between ARP6 and SWC6 has been proposed in yeast (Wu *et al.*, 2005). A search for an *Arabidopsis* protein homologue of the yeast SWC6/VSP71 subunit led to the identification of a related protein, encoded by the At5g37055 gene. To investigate the role of *Arabidopsis* SWC6 in plant development, T-DNA insertion lines were searched in different collections, and two different lines were identified (Fig. 1A) and designated as *swc6-1* and *swc6-2*. Line SAIL\_1142\_C03 (*swc6-1*) bore an insertion in exon 2 of the At5g37055 locus, in a position corresponding to nucleotide 146 of the coding region. RT-PCR analysis, using primers forward (F) and reverse (R), upstream of the T-DNA insertion, demonstrated no expression of *SWC6* mRNA in homozygous *swc6-1* plants (Fig. 1B). In the same way, line SAIL\_536\_A05 (*swc6-2*) contained a T-DNA inserted in the promoter region, upstream of the 5' UTR of *SWC6* mRNA. RT-PCR analysis was unable to detect *SWC6* mRNA in *swc6-2* plants (data not shown). Because both alleles produced a similar array of phenotypes, *swc6-1* was chosen to carry out all the genetic and phenotypic analyses. Heterozygous plants displayed a wild-type phenotype, indicating that both *swc6-1* and *-2* were recessive. Plants homozygous for *swc6-1* mutations were early flowering mainly under non-inductive SD photoperiods (Fig. 2A, B, Table 1). The fact that *swc6-1* mutants flower earlier under inductive photoperiods indicates that this mutation does not abolish the flowering photoperiodic response. Earliness was associated with a reduction in the length of all developmental phases of the plant (Fig. 2C), based on leaf shape and leaf trichome distribution (Telfer *et al.*, 1997).

This reduction was more dramatic for adult rosette leaves, which were highly reduced in *swc6* mutant plants under both LD and SD (Fig. 2C). This behaviour is similar to that exhibited by other early flowering mutants such as *esd1*, *esd4*, and *ebs*, which also show a major reduction in the adult vegetative phase (Gomez-Mena *et al.*, 2001; Reeves *et al.*, 2002; Martin-Trillo *et al.*, 2006).

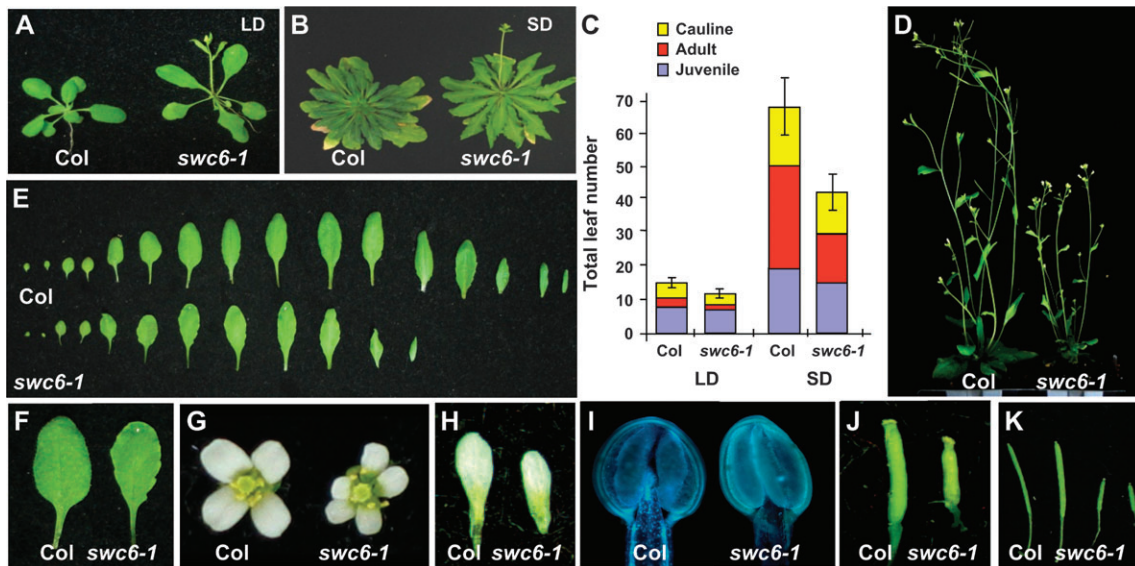
Apart from their flowering-time phenotype, *swc6* mutants also displayed complex pleiotropic alterations of both vegetative and reproductive development. Mutant plants produced more cauliflorescence shoots than Col. This was accompanied by a shortening of inflorescence internodes, resulting in a reduction in inflorescence length and apical dominance (Fig. 2D). Furthermore, *swc6* leaves are smaller and more curled than wild-type leaves, and frequently have serrated margins (Fig. 2E, F). As shown in Fig. 2G–J, *swc6* flowers displayed several developmen-

tal abnormalities, including a reduction in size as compared with wild-type flowers. Petals of mutant plants were smaller than wild-type petals and slightly wrinkled (Fig. 2H); mutant anthers were also smaller than those of the wild type and often presented a heart shape characteristic of immature anthers (Fig. 2I); indeed the *swc6-1* mutant showed a reduced fertility associated with a reduction in the amount of pollen. In the same way, mutant carpels (Fig. 2J) and siliques (Fig. 2K) were approximately half the length in *swc6* mutants of those in wild-type plants. In addition, *swc6* flowers frequently bear extra perianth organs. This phenotype was more extreme under SD, where *swc6* flowers contained  $5.8 \pm 0.8$  sepals and  $5.7 \pm 0.9$  petals per flower (Fig. 2G). Similar phenotypes have been described in *pie1* and *esd1/suf3/arp6* mutant plants, suggesting that these proteins may form part of a complex that regulates multiple aspects of *Arabidopsis* development.

To complement the mutant *swc6* phenotype, an At5g37055 cDNA driven by the 35S promoter was introduced into *swc6-1* mutants. Several transgenic lines of 35S:SWC6 were generated (Fig. 3A). Northern blot analysis showed high accumulation of SWC6 mRNA in the transgenic lines that complemented all the developmental defects observed in the mutant plants (Fig. 3A, Table 1). It is significant that overexpression of SWC6 in *swc6* or overexpression of ARP6 in *esd1* (Fig. 3B) did not cause an additional delay in flowering time. Consistently,



**Fig. 1.** Isolation of SWC6 loss-of-function mutations. (A) Genomic structure of the SWC6 gene and locations of T-DNA insertions. Primers F and R used for RT-PCR experiments are indicated. (B) SWC6 expression in the *swc6-1* mutant. RT-PCR analysis showing the level of expression of SWC6 mRNA in Columbia wild-type and *swc6-1* plants grown under LD photoperiods. UBQ10 was used as an internal control.



**Fig. 2.** *swc6* mutants are early flowering and display pleiotropic alterations in vegetative and reproductive development. (A) Flowering-time phenotype of *swc6* mutants under LD. Wild-type Col and *swc6-1* 2-week-old plants are shown. (B) Flowering phenotype of *swc6* mutants under non-inductive photoperiods. Col and *swc6-1* 4-week-old plants grown under SD. (C) Histogram comparing the number of juvenile, adult, and cauline leaves in Col and *swc6-1* plants grown under both LD and SD photoperiods. (D) Col and *swc6* 4-week-old plants grown under LD, showing a reduction in inflorescence length and weak apical dominance in the mutant. (E) Rosette and cauline leaves of wild-type and *swc6-1* plants grown under LD conditions. All leaves, including cotyledons, are shown in order of production from the first true leaf. (F) Rosette leaves of Col and *swc6-1* plants grown under SD conditions. (G) Detached flowers showing the increased number of petals in *swc6* mutant flowers. (H) Detached petals showing the size reduction and wrinkled appearance of *swc6* mutant petals. (I) DAPI staining of wild-type (left) and *swc6-1* mutant (right) anthers. (J) Wild-type (left) and *swc6-1* (right) flower gynoecium. (K) Wild-type (left) and *swc6-1* (right) siliques.

the *SWC6* or the *ARF6* overexpression lines in the Col genetic background did not show any additional flowering phenotype.

### *SWC6* encodes a HIT-type zinc-finger protein

To confirm the genomic structure of *SWC6*, a cDNA of 516 bp was identified and sequenced. *SWC6* is a single gene in *Arabidopsis*; it possesses four exons and encodes a nuclear HIT-type zinc-finger protein of 171 amino acids (Choi *et al.*, 2007), whose homologues, SWC6 and ZNHIT1, are subunits of the yeast SWR1 and mammalian SRCAP (SWI2/SNF2-related CBP activator protein) complexes, respectively (Mizuguchi *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2005). AtSWC6 is also closely related to *Nicotiana benthamiana*

**Table 1.** Flowering time of *swc6*, double mutants with *swc6*, and *35S::SWC6* transgenic plants

ND, Not determined.

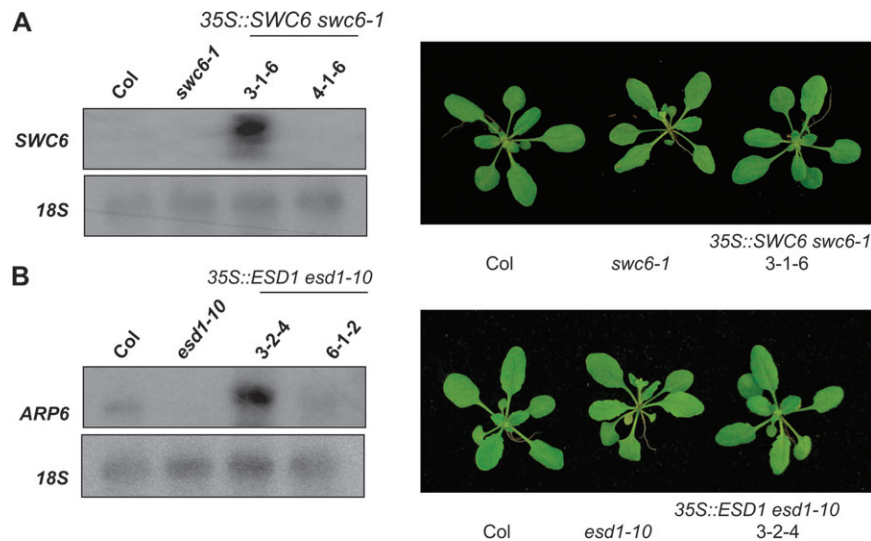
Genotype	Long days	Short days
Col	13.3±1.5	69.5±4.5
<i>swc6-1</i>	9.5±0.6	38.5±4.6
<i>esd1-10</i>	8.9±0.7	31.8±8.3
<i>swc6-1 esd1-10</i>	7.9±0.3	31.3±6.3
<i>fve-3</i>	34.3±3.9	>110
<i>swc6-1 fve-3</i>	13.7±1.6	62.9±5.3
<i>FRI</i>	34.7±7.1	>110
<i>swc6-1 FRI</i>	21.2±3.7	79.3±9.1
<i>frc-3</i>	12.1±1.4	62.7±4.1
<i>swc6-1 frc-3</i>	8.7±0.7	40.5±3.3
<i>35S::SWC6 swc6-1(3-1-6)</i>	14.6±1.2	ND
<i>35S::SWC6 swc6-1(4-1-6)</i>	8.9±0.5	ND
<i>35S::ESD1 esd1-10(3-2-4)</i>	12.7±0.8	ND
<i>35S::ESD1 esd1-10(6-1-2)</i>	8.7±0.9	ND

CIBP1, identified as a Plum pox virus cylindrical inclusion-interacting protein, and to a SWC6 rice protein (OsSWC6). All these proteins have seven cysteines and one histidine highly conserved in a C-terminal region, which are part of a HIT-type zinc finger domain (Fig. 4A).

Semi-quantitative RT-PCR experiments demonstrated that *SWC6* transcript was present at variable levels in all the tissues tested (Fig. 4B). *AtSWC6* expression was more strongly detected in roots, flowers, and flower buds (Fig. 4D). Similar expression profiles of *SWC6* are obtained from Genevestigator (<http://www.genevestigator.ethz.ch>; Zimmermann *et al.*, 2004). In the transgenic plants expressing a 353 bp transcriptional fusion of the *AtSWC6* promoter region with *GUS* (*AtSWC6p::GUS*), *GUS* expression was detected in actively dividing cells such as root and shoot apices, lateral root primordia, trichomes, inflorescences, flowers, etc. (Fig. 4D). Interestingly, *GUS* expression was particularly high in anthers (Fig. 4D). By contrast, *GUS* expression was rarely detected in stems, leaves, seeds, and siliques (data not shown). Analysis of the *SWC6* promoter region fused to *GUS* shows the presence of various *cis*-acting elements, including sequences known to confer anther/pollen-specific gene expression (Fig. 4C).

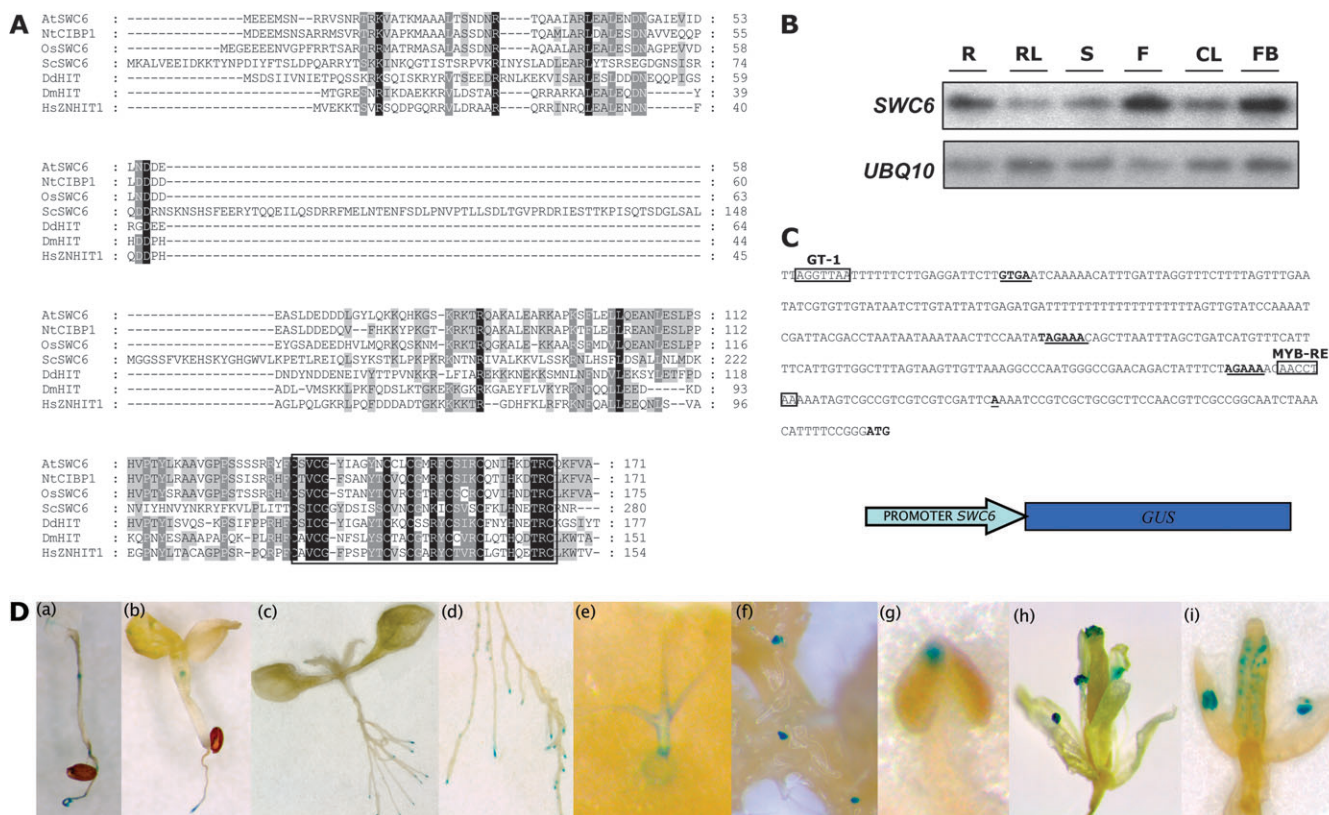
### The *swc6-1* mutation suppresses the late flowering of *FRI* and autonomous pathway mutants

The early-flowering phenotype of *swc6* mutants suggested that *SWC6* could negatively interact with a flowering-promoting pathway or alternatively interact positively with a flowering-repressor pathway in *Arabidopsis*.



**Fig. 3.** Phenotype of *SWC6* and *ESD1/SUF3/ARF6* overexpression lines. (A) Col, *swc6-1*, and *35S::SWC6 swc6-1* transgenic *Arabidopsis* (line 3-1-6) plants grown for 2 weeks under LD conditions. In the left panel a northern blot hybridization shows the level of expression of *SWC6* in these plants and in the *35S::SWC6 swc6-1* 4-1-6 line, a representative that did not show complementation of the *swc6* mutant phenotype. (B) Col, *esd1-10*, and *35S::ESD1 esd1-10* transgenic *Arabidopsis* (line 3-2-4) plants grown for 2 weeks under LD conditions. In the left panel a northern blot hybridization shows the level of expression of *ESD1* in these plants together with the *35S::ESD1 esd1-10* 6-1-2 line, which did not show complementation of the *esd1* mutant phenotype. *18S* ribosomal probe was used as a control of loading and integrity of RNAs in the northern blots.





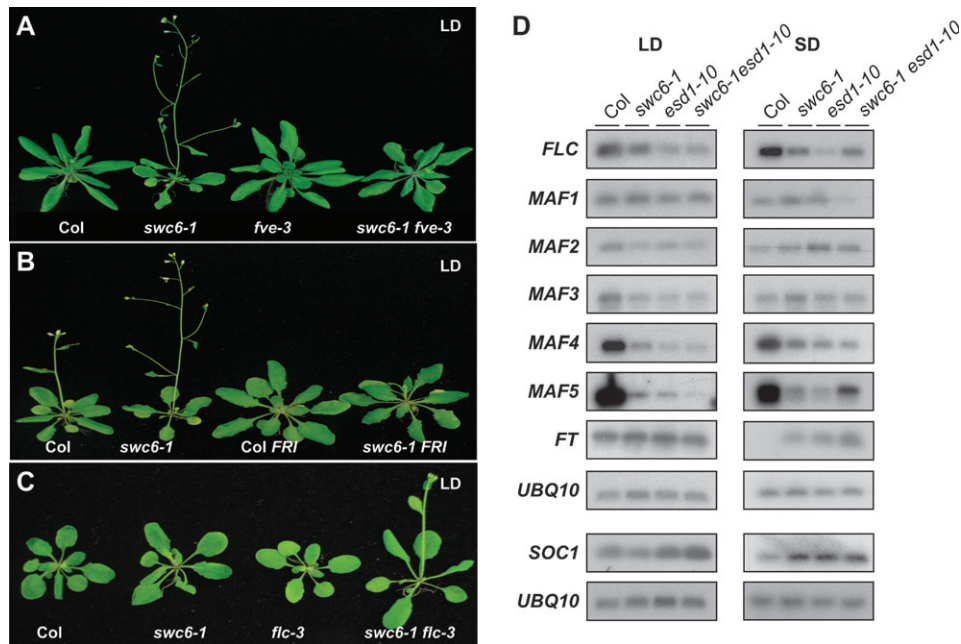
**Fig. 4.** *SWC6* encodes a nuclear HIT-type zinc-finger protein. Sequence comparisons of AtSWC6 with tobacco (NtCIBP1), rice (Os), yeast (Sc), *Dyctiostelium* (Dd), *Drosophila* (Dm), and human (HsZNHIT1) SWC6 homologues. Amino acid residues in black are identical and those in grey are functionally similar in all sequences. Boxed regions indicate the HIT-type zinc-finger domain, with seven cysteines and one histidine highly conserved. (B) *SWC6* expression in different organs of 25-d-old Col plants. RT-PCR assays were performed with RNA prepared from different tissues. R, Roots; RL, rosette leaves; S, main stem; F, flowers; CL, cauline leaves; FB, flower buds. RT-PCR products were blotted and hybridized with a specific probe for the *SWC6* gene. *UBQ10* was used as a loading control. (C) Nucleotide sequence of promoter region and 5' UTR of the *SWC6* gene. ATG at the end of the sequence represents the initiation codon. The first base of the transcript (+1) is bold and underlined. The GTGA and AGAAA sequences in the regulatory regions, which are similar to the conserved motifs in the promoter regions of some other anther/pollen-specific genes are indicated in bold and underlined. A GT-1 motif and a MYB-response element are boxed. (D) Tissue expression pattern of *SWC6*. Spatial expression patterns of *SWC6* were examined by GUS staining in the *SWC6p::GUS* transgenic plants. Histochemical GUS staining was performed in whole (a) 2-, (b) 4-, and (c) 8-d-old seedlings, in (d) lateral root, (e) trichomes, (f) apical meristem region, (g) anthers, and (h) and (i) flowers.

Mutations affecting *ESD1*, another member of the SWR1 complex, suppress the late flowering of *FRI* and autonomous pathway mutants (Martin-Trillo *et al.*, 2006) and, for that reason, the genetic analysis was focused initially in combinations between *swc6* and these genotypes. To test the possible interaction between *SWC6* and autonomous pathway genes, the flowering phenotype of the *swc6 fve-3* double mutant was analysed (Fig. 5A). Under LD, some of the *swc6 fve-3* double mutants were indistinguishable from *swc6*, although, on average, *swc6 fve-3* produced a few more leaves than *swc6* (Table 1); this result indicates that the late-flowering phenotype of *fve* mutations requires *SWC6*.

The quasi-epistatic interaction of *swc6* with *fve* mutations suggests that *swc6* might cause early flowering, either by increasing the activity of the autonomous pathway downstream of *FVE* or by bypassing the requirement for the autonomous pathway causing a reduction of *FLC* expression. When the *swc6* mutation was in-

roduced into *FRI*-containing Col (Col:*FRI SF2*, referred to as *FRI* below) (Michaels and Amasino, 1999), which displays a very late-flowering phenotype, *swc6* partially suppressed *FRI*-mediated late flowering (Fig. 5B, Table 1). The plants harbouring the *swc6 FRI* combination showed much earlier flowering than *FRI* (Table 1).

In order to test if *swc6* suppresses the effect of the autonomous pathway mutations and *FRI* by reducing *FLC* mRNA levels, the abundance of the *FLC* mRNA in wild-type and *swc6* seedlings was compared. *FLC* transcript levels were reduced by the *swc6* lesion (Fig. 5D), suggesting that *SWC6* is required to maintain high *FLC* expression levels, either as promoted by *FRI* or by mutations that impair the autonomous pathway. In agreement with this scenario, the expression of the floral integrator genes *FT* and *SOC1*, normally repressed by *FLC* (Moon *et al.*, 2003), was up-regulated in the *swc6* mutants under SD conditions where the early-flowering phenotype of the mutant is more conspicuous (Fig. 5D).



**Fig. 5.** Suppression of *FLC*-dependent late flowering by *swc6* mutations. (A) Flowering phenotype of double mutant *swc6 fve* plants grown under LD. (B) Flowering phenotype of lines where an active allele of *FRI* is combined with *swc6* grown under LD. (C) Flowering phenotype of *swc6 flc* double mutant plants grown under LD conditions. (D) Analysis of the expression of *FLC*, *FT*, *SOC1*, and the *MAF* genes in Col, *swc6*, *esd1*, and *swc6 esd1* double mutant plants. Total RNA was extracted from pools of fifty 8-d-old (LD) and 23-d-old (SD) seedlings collected 8 h and 16 h after dawn under SD and LD, respectively. For *SOC1* expression, samples were taken 4 h and 8 h after dawn for SD and LD, respectively. Expression was monitored by RT-PCR over 25 cycles for *FLC*, 32 cycles for *FT*, 25 cycles for *SOC1*, 30 cycles for *MAF1*, 28 cycles for *MAF2*, and 35 cycles for *MAF3*, *MAF4*, and *MAF5* genes. The *UBQ10* control was amplified during 20 cycles. RT-PCR products were blotted and hybridized with specific probes for each gene.

Although the effects of *swc6* mutations on flowering time are more readily observed in the late-flowering *FRI* and *fve* mutant backgrounds, as discussed above, the fact that *swc6* mutants also flower earlier than the rapid-flowering wild-type strain Col (Fig. 2A, Table 1) suggests that, in addition to regulating *FLC* expression, *SWC6* plays other roles in the control of flowering time. To determine the fraction of the *swc6* early-flowering phenotype that is independent of *FLC*, the phenotypic effect of the *swc6-1* mutation in an *flc* null (*flc-3*) background (Michaels and Amasino, 1999) was examined. When combined with *flc-3*, the *swc6* mutation reduces the number of leaves produced by *flc-3* (Fig. 5C, Table 1). In addition, as for *ESD1*, loss of function of *SWC6* also resulted in down-regulation of some other members of the *FLC/MAF* gene family, particularly *MAF4* and *MAF5* (Fig. 5D), suggesting that these *MAF* genes represent additional regulatory targets of *SWC6* and confirming that *swc6* mutations have an *FLC*-independent effect on flowering time.

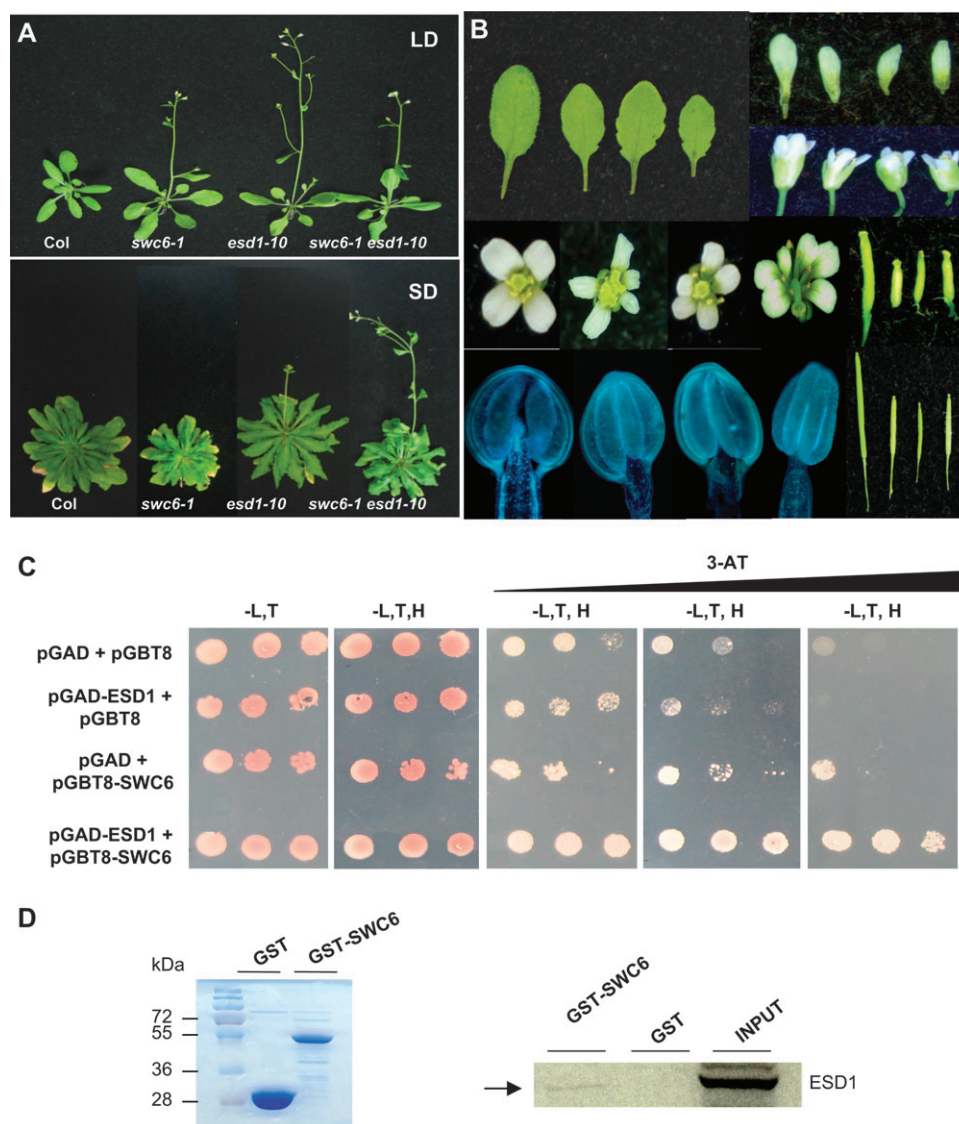
#### Genetic and physical interaction between *SWC6* and *ESD1/SUF3/ARP6*

Previous observations indicate that the *swc6* mutant displays a number of phenotypic characteristics similar to those of *esd1* plants (Fig. 1) (Martin-Trillo *et al.*, 2006). One possibility is that *SWC6* and *ESD1/SUF3/ARP6* may act in the same pathway or alternatively participate in

different parallel pathways controlling similar processes. To investigate this aspect further, *swc6 esd1* double mutants were generated. As shown in Fig. 6A, *swc6 esd1* plants were indistinguishable from *esd1* plants. The flowering time of *swc6 esd1* double mutants was identical to that of *esd1* plants (Table 1), and the expression of floral integrator genes in *swc6 esd1* plants was in general similar to that observed for each parental mutant (Fig. 5D). In addition, vegetative and reproductive phenotypes of the *swc6 esd1* double mutant were quite similar to those observed in *esd1* mutants (Fig. 6B). Taken together, the above results are consistent with *SWC6* and *ESD1* acting in the same genetic pathway.

Since yeast homologues of these proteins are part of the SWR1 complex and several lines of evidence have suggested the existence of this complex in plants, a possible physical interaction between these *Arabidopsis* proteins was analysed by yeast two-hybrid assays. To do this, full-length *SWC6* protein was expressed as bait, fused to the GAL4 DNA binding domain (GBD), and full-length *ESD1/SUF3/ARP6* protein as the prey, fused to the GAL4 activation domain (GAD). As shown in Fig. 6C, yeast co-expressing the GAD-*ESD1* and GBD-*SWC6* fusion proteins were able to grow in selective medium without His plus 3-AT, due to the activation of the *GAL1::HIS3* reporter gene. To confirm this interaction further, *in vitro* pull-down experiments using glutathione





**Fig. 6.** Genetic and physical interaction between SWC6 and ESD1/SUF3/ARP6. (A) Flowering phenotype of Col, *swc6*, *esd1*, and *swc6 esd1* double-mutant plants under both LD and SD photoperiods. (B) Pleiotropic defects in vegetative and reproductive organs displayed by *swc6 esd1* mutant plants. Photographs illustrating leaves, petals, flowers, carpels, DAPI-stained anthers, and siliques of wild type (left), *esd1* (middle left), *swc6* (middle right), and *swc6 esd1* mutants (right). (C) SWC6 and ESD1 interact in yeast. Full-length SWC6 and ESD1 proteins were fused to the GAL4 DNA binding and activation domain, respectively. Yeast transformed with these constructs or empty vectors (pGBT8 and pGAD) were grown in non-selective (SC-L,-T) or selective media (SC-L,-T,-H) with increasing concentrations of 3-AT (5, 10, and 25 mM). Five-fold yeast dilutions were plated left to right in each panel. (D) Pull-down assay with SWC6 and ESD1 proteins. Bead-bound GST or GST-SWC6 fusion proteins were incubated with [<sup>35</sup>S]Met-labelled ESD1 protein. Retained ESD1 protein was visualized after exposure and autoradiography of the dried gel.

S-transferase (GST)-SWC6 and *in vitro*-translated ESD1 protein were performed. As shown in Fig. 6D, GST-SWC6 was able to interact with ESD1, but not GST alone. Together, the results show interaction among SWC6 and ESD1, providing further evidence for the existence of a SWR1 complex in *Arabidopsis*.

*SWC6* is required to activate *FLC* transcription through both histone acetylation and methylation mechanisms

*FLC* gene expression integrates signals coming from different pathways involved in the regulation of the floral

transition (Schmitz and Amasino, 2007). Recent work has demonstrated the role of histone modification in the regulation of *FLC* expression through *FRI*, the autonomous, the vernalization, and the *PAF1* pathways (He *et al.*, 2003, 2004; Ausin *et al.*, 2004; Bastow *et al.*, 2004; Sung and Amasino, 2004; He and Amasino, 2005; Kim *et al.*, 2005). These results have also identified the first intron of *FLC* as a relevant region for histone modification (He *et al.*, 2003, 2004; Ausin *et al.*, 2004; Bastow *et al.*, 2004; Sung and Amasino, 2004) and transcriptional regulation (Gendall *et al.*, 2001; Sheldon *et al.*, 2002). Because *swc6* suppresses the late-flowering phenotype of

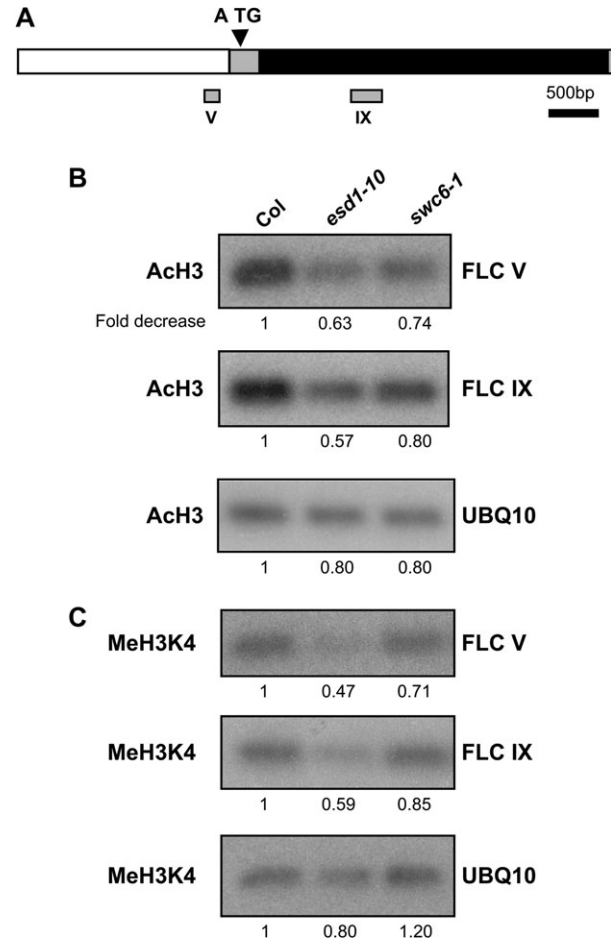
*five* autonomous pathway mutants and FVE represses *FLC* transcription through a histone deacetylation mechanism, it was speculated that SWC6 could be required for the acetylation of histones necessary to activate *FLC* expression. In fact, another putative component of the SWR1 complex, ESD1/SUF3/ARP6, has been previously reported to be required for setting this epigenetic marker in *FLC* chromatin (Martin-Trillo *et al.*, 2006).

To determine whether SWC6 promotes histone acetylation of the *FLC* chromatin, ChIP assays were performed (Fig. 7). Chromatin of Col, *esd1-10*, and *swc6-1* plants was immunoprecipitated by using antibodies against acetylated H3, and PCR was used to amplify two DNA fragments spanning regions of the promoter and the first intron of *FLC*, respectively, from the precipitated chromatin (Fig. 7A). These probes were among those that consistently showed the biggest differences in previous experiments involving the *esd1* mutant (Martin-Trillo *et al.*, 2006). For the probes assayed, *FLC*-amplified sequences were consistently more abundant in DNA from precipitated chromatin of Col than from chromatin of the *swc6* and *esd1* mutant plants (Fig. 7B), indicating that both SWC6 and ESD1/SUF3/ARP6 affect the levels of H3 acetylation of *FLC*. Therefore, both proteins are required to activate *FLC* expression through a mechanism involving the histone acetylation of *FLC* chromatin.

This assay was extended to explore further if SWC6 also has an effect on histone methylation at the *FLC* locus, as does *ESD1*. It has been shown recently that H3K4 hypertrimethylation is associated with actively transcribed *FLC* chromatin (He *et al.*, 2004), and we wondered whether SWC6 was required for the setting of this epigenetic marker on *FLC* chromatin. Compared with wild-type plants, the trimethylated H3K4 levels in the *FLC* probes assayed were lower in *swc6* and *esd1* mutant plants than in Col (Fig. 7C), indicating that SWC6 is also required for the hypertrimethylation of H3K4 in *FLC* chromatin. Although in *swc6* background a decrease in both H3 acetylation and H3K4 trimethylation was consistently observed with the probes assayed, this effect was always less pronounced than that observed in *esd1* mutants, suggesting a stronger involvement of ESD1 in these modifications as compared with SWC6.

## Discussion

In *Arabidopsis*, flowering time is regulated by a complex genetic network where the floral repressor *FLC* has a pivotal role integrating the autonomous and vernalization pathways and down-regulating the expression of *FT* and *SOC1* floral integrators (Searle *et al.*, 2006). The expression level of these integrators is mainly responsible for the correct flowering time (Baurle and Dean, 2006). Transcriptional regulation of *FLC* is a central checkpoint in both winter and summer annual accessions of *Arabi-*



**Fig. 7.** Effect of *swc6* mutation on histone H3 acetylation and methylation in the *FLC* genomic region by ChIP analysis. (A) *FLC* genomic region analysed by ChIP. The white box corresponds to the promoter *FLC* region, grey boxes to exons, and the black box to the first intron. The two *FLC* fragments analysed by semiquantitative PCR are depicted and numbered. (B) PCR products after 25 cycles of Col, *esd1-10*, and *swc6-1* mutant plants using as template DNA purified from chromatin immunoprecipitated with antibodies against acetylated H3 (AcH3). *UBQ10* was amplified during 22 cycles and used as control for DNA quantification. Fold decrease in H3 acetylation of *swc6* and *esd1* mutants over Col is shown. (C) PCR products after 25 cycles of Col, *esd1-10*, and *swc6-1* mutant plant PCR products as in (B) but using as template DNA purified from chromatin immunoprecipitated with antibodies against trimethylated H3K4 (MeH3K4). Fold decrease in H3K4 methylation of mutants over the wild-type ecotype is shown. The data provided are representative and are from one of three independent experiments.

*dopsis*. Recently, the regulation of *FLC* through chromatin modifications has been intensively demonstrated (reviewed by Reyes, 2006; Sung and Amasino, 2006).

In this work, *Arabidopsis swc6* mutants that are affected in a putative orthologue of the SWR1 chromatin remodelling complex have been characterized. SWC6 is the only *Arabidopsis* gene homologue of yeast SWC6/VPS73 (Krogan *et al.*, 2003; Kobor *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005). Recently, the function of the ATP-dependent chromatin remodelling complex SWR1 has been intensively studied in yeast (Wu *et al.*, 2005). The subunits

of SWR1 and of the mammalian homologue SRCAP complexes have been biochemically identified and analysed (Kobor *et al.*, 2004; Mizuguchi *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005), and the evidence for the presence of a homologous complex in plants has been provided (Choi *et al.*, 2007; Deal *et al.*, 2007). In addition, how SWR1 homologues affect development in higher eukaryotes remains largely unknown. Homologues of most SWR1 components are present in *Arabidopsis*, and thus the function of this complex is being genetically dissected.

Phenotypical analyses of *swc6* mutants revealed a complex array of pleiotropic defects affecting vegetative and reproductive development, including a reduction in flowering time and phase length (Fig. 2). *swc6* causes early flowering mainly through the reduction in *FLC* expression (Fig. 5), suggesting a role for the SWR1 complex in the regulation of flowering time. Genetic analyses have revealed that the early flowering phenotype of *swc6* mutants is almost completely epistatic over the flowering time delay caused by *fve* mutation in the autonomous pathway, and that *swc6* partially suppresses the late-flowering phenotype conferred by active *FRI* alleles (Fig. 5). These genetic interactions correlate at the molecular level with a decrease in the steady-state levels of *FLC* mRNA in *swc6* mutant alleles (Fig. 5D). Together, these results indicate that SWC6 is required for the proper expression of *FLC*. The phenotypic analysis of *swc6* mutants indicates that this protein also controls other developmental processes such as leaf and flower morphology (Fig. 2), suggesting that SWC6 regulates other genes involved in plant development. For instance, *swc6* plants show smaller leaves with serrated margins, which might reflect defects in cell proliferation along the margins of leaf primordia. In addition, *swc6* mutant flowers display extra floral perianth organs, suggesting a role for the SWR1 complex in the control of floral development.

Mutations in different *Arabidopsis* homologues of SWR1 components such as *PIE1*, *ESD1/SUF3/ARP6*, and *SWC6/SEF* cause similar developmental defects (Noh and Amasino, 2003; Choi *et al.*, 2005, 2007; Martin-Trillo *et al.*, 2006; March-Diaz *et al.*, 2007; this study), and these genes display similar expression patterns, although SWC6 is more highly expressed in anthers (Fig. 4D). This may be explained by the presence of various *cis*-acting elements (AGAAA and GTGA) in the *SWC6* promoter region, known to confer anther/pollen-specific gene expression (Gupta *et al.*, 2007), and is consistent with a role for SWC6 in anther and/or pollen development (March-Diaz *et al.*, 2007; this study) (Fig. 4C). All three mutants cause suppression of late flowering in autonomous pathway mutants as well as in *FRI*-containing lines and other developmental defects including leaf serration, weak apical dominance (bushy aspect), flowers with extra petals, and short siliques. They also show earlier flowering

than an *flc*-null mutant, suggesting that flowering inhibition mediated by these proteins occurs through both *FLC*- and *FLC*-like gene-dependent pathways (Noh and Amasino, 2003; Choi *et al.*, 2005, 2007; Martin-Trillo *et al.*, 2006). However, some phenotypes are more dramatic in *pie1* plants than in *swc6/sef* and *esd1/suf3/arp6* plants (Noh and Amasino, 2003). *pie1* displays a stronger reduction in fertility, a very notable reduction in primary inflorescence elongation, and smaller and deformed leaves (Noh and Amasino, 2003; March-Diaz *et al.*, 2007), phenotypes that were not obvious in *esd1/suf3/arp6* or in *swc6/sef* (Noh and Amasino, 2003; Choi *et al.*, 2005, 2007; Deal *et al.*, 2005; Martin-Trillo *et al.*, 2006; March-Diaz *et al.*, 2007). Moreover, *pie1* plants show a stronger down-regulation of *FLC* and *MAF4* transcript levels than the *esd1* and *swc6* plants (Deal *et al.*, 2007; March-Diaz *et al.*, 2007). Furthermore, the *MAF5* gene was deregulated in the *pie1*, *esd1/suf3/arp6*, and *swc6/sef* mutant (Fig. 5D; Martin-Trillo *et al.*, 2006; March-Diaz *et al.*, 2007). Altogether, these observations suggest that PIE1 might fulfil functions that are at least partially independent from those of SWC6 and ESD1; a tempting possibility is that PIE1 may participate in other chromatin remodelling complexes besides SWR1.

SWC6 and ARP6 yeast homologues are tightly associated in SWR1C, being necessary for the interaction with the SWC2 subunit and for nucleosome binding (Wu *et al.*, 2005). According to this, *Arabidopsis* SWC6 and ESD1/SUF3/ARP6 have a similar developmental function. The phenotypes of *swc6* and *esd1* mutants are quite comparable, and the *esd1 swc6* double mutant has the same phenotype and causes similar alterations in gene expression as any single mutant (Figs 5D, 6B), indicating that both genes act in the same genetic pathway. Together with the absence of any obvious developmental phenotype in plants overexpressing either *ESD1* or *SWC6*, the results described in this study strongly suggest that ESD1 and SWC6 act together as a protein complex. The protein interaction analyses confirmed that both proteins can physically interact (Fig. 6C, D). Biochemical characterization of the yeast SWR1 complex indicates that removal of either *arp6* or *swc6* results in the reciprocal loss of the other subunit from the complex and also in the loss of two other proteins, Swc2 and Swc3, suggesting that Arp6, Swc6, Swc2, and Swc3 form a subcomplex associated with Swr1 (Wu *et al.*, 2005). Similarly, *Arabidopsis* ARP6 and SWC6, together with SWC2 and other unidentified factors, may form a subcomplex that associates with PIE1 (Choi *et al.*, 2007; March-Diaz *et al.*, 2007). Again, this is consistent with a very similar phenotype of the *swc6* and *esd1/suf3/arp6* mutants but a slightly different phenotype of the *pie1* mutant.

The SWR1 complex in yeast catalyses the replacement of nucleosomal H2A with the H2A.Z variant, ensuring full activation of underlying genes (Guillemette *et al.*,



2005; Li *et al.*, 2005; Raisner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Recent studies have shown that two H2A.Z nucleosomes flank a nucleosome-free region containing the transcription initiation site in promoters of both active and inactive genes in yeast and that H2A.Z-bearing nucleosomes facilitate transcription activation through their susceptibility to loss, thereby helping to expose promoter DNA (reviewed in Raisner and Madhani, 2006). In *Arabidopsis*, the histone variant H2A.Z has been identified within *FLC*, *MAF4*, and *MAF5* chromatin, occupying regions near both the transcription start and termination sites on the three genes examined (Deal *et al.*, 2007). In addition, H2A.Z interacts with both PIE1 and AtSWC2, and knockdown of H2A.Z caused a phenotype similar to that of *piel*, *esd1/suf3/arp6*, and *swc6* (Choi *et al.*, 2007). Loss of H2A.Z from *FLC* chromatin in *esd1/suf3/arp6* and *piel* mutants results in reduced *FLC* expression and premature flowering, indicating that this histone variant is required for a high level of expression of *FLC* (Deal *et al.*, 2007). These observations support the existence of an SWR1-like complex in plants that is targeted to different loci including *FLC*, and show that H2A.Z can poise transcriptional activation in plants. Interestingly, the spatial distribution and the overall levels of H2A.Z on *FLC* was the same in samples that had a 10-fold higher level of *FLC* expression (Deal *et al.*, 2007), suggesting that H2AZ by itself does not activate *FLC* gene expression and that the replacement of nucleosomal H2A with H2A.Z may form a variant nucleosome with unique tails that might bind specific regulatory proteins to help promote *FLC* gene activation.

High levels of *FLC* expression are correlated with H3 and H4 hyperacetylation and trimethylation of H3K4 and H3K36 at the *FLC* locus (He *et al.*, 2003, 2004; Ausin *et al.*, 2004; Bastow *et al.*, 2004; Sung and Amasino, 2004; Zhao *et al.*, 2005). Martin-Trillo *et al.* (2006) have recently reported that *esd1/suf3/arp6* mutants present low levels of histone H3 acetylation and H3K4 methylation in the *FLC* locus; this work demonstrates a comparable behaviour in the *swc6* mutant, although the effect was consistently more conspicuous for *esd1* (Fig. 7). Whether ARP6 and SWC6, and, consequently, the SWR1 complex are directly involved in setting these epigenetic markers or whether these alterations are secondary consequences is still unclear. Moreover, it remains to be determined whether the effect of *esd1/suf3/arp6* and *swc6* on the expression of other *MAF* genes takes place through similar mechanisms.

A human H2A.Z complex equivalent to the yeast SWR1 complex has histone acetyltransferase activity (Owen-Hughes and Bruno, 2004), and the Swr1 complex shares several subunits with the NuA4 histone acetyltransferase. Furthermore, mutants of these two complexes share several phenotypes, suggesting that they may work together, which might help to understand the role of

ESD1/SUF3/ARP6 and SWC6 in histone acetylation. In the same way, the fact that components of the Swr1 complex were found to interact genetically with the PAF1 complex in yeast might explain the role of ESD1 and SWC6 in the trimethylation of H3K4 in *FLC* chromatin (Mueller and Jaehning, 2002; Squazzo *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2003, 2004). Like the yeast PAF1 complex, the PAF1-like complex in *Arabidopsis* may also recruit an H3K4 methyl transferase to *FLC* to regulate its expression (Kim *et al.*, 2005). Indeed, mutations in *Arabidopsis* homologues of the components of the *PAF1* complex cause a decrease in the trimethylation of H3K4 in *FLC* chromatin, and provoke early flowering and small leaves, similar to the *esd1* and *swc6* mutations (He *et al.*, 2004), raising the possibility that all of these genes are in the same pathway and regulate similar targets.

We propose that the H2A.Z variant may serve to poise the *FLC* gene, and maybe other related genes, in a state competent for activation by other factors, rather than activating transcription directly (Deal *et al.*, 2007). This may reflect the ability of H2A.Z to facilitate nucleosome remodelling (Santisteban *et al.*, 2000) and/or to recruit the transcription machinery (Adam *et al.*, 2001) or other chromatin remodelling complexes to allow high-level transcription under certain conditions. Thus, in the absence of H2A.Z in *swc6*, *esd1/suf3/arp6*, and *piel* mutants, *FLC* levels remain low even in the presence of strong activators such as *FRI* (Noh and Amasino, 2003; Choi *et al.*, 2005; Deal *et al.*, 2005, 2007; Martin-Trillo *et al.*, 2006; this study), resulting in early flowering.

Biochemical characterization of the SWR1C homologue and functional studies using transcriptomic analyses and ChIP-to-chip hybridization will help to identify additional genes regulated by this complex and to understand the crucial role of the SWR1 complex plant homologue in chromatin remodelling processes related to leaf and flower development and to the control of flowering time.

## Acknowledgements

We would like to thank Dr Richard Amasino for kindly providing *flc-3* and *FRI-Col* lines, the ABRC and NASC for supplying the T-DNAs lines used in this study, and GENOSCOPE for the ESD1/SUF3/ARP6 and SWC6 cDNA clones. GST-SWC6 was a gift of Dr Jose Carlos Reyes. This work was supported by grants BIO2005-00251 to JAJ and BIO2004-00494 to MP from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología. AL and AG-Z were funded by a predoctoral fellowship from Dirección General de Investigación, Secretaría General de Política Científica y Tecnológica (Spain), and LL-G by an INIA predoctoral fellowship. We thank to all members of Jarillo's and Piñeiro's laboratories for helpful discussions, and D Saez for his skilful technical assistance.

## References

- Adam M, Robert F, Larochelle M, Gaudreau L. 2001. H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of

- RNA polymerase II under specific conditions. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 6270–6279.
- Ausin I, Alonso-Blanco C, Jarillo JA, Ruiz-Garcia L, Martinez-Zapater JM.** 2004. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nature Genetics* **36**, 162–166.
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C.** 2004. Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* **427**, 164–167.
- Baurle I, Dean C.** 2006. The timing of developmental transitions in plants. *Cell* **125**, 655–664.
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C.** 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell* **16** (Suppl.), S18–S31.
- Cai Y, Jin J, Florens L, Swanson SK, Kusch T, Li B, Workman JL, Washburn MP, Conaway RC, Conaway JW.** 2005. The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 13665–13670.
- Choi K, Kim S, Kim SY, Kim M, Hyun Y, Lee H, Choe S, Kim SG, Michaels S, Lee I.** 2005. *SUPPRESSOR OF FRIGIDA3* encodes a nuclear ACTIN-RELATED PROTEIN6 required for floral repression in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**, 2647–2660.
- Choi K, Park C, Lee J, Oh M, Noh B, Lee I.** 2007. Arabidopsis homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* **134**, 1931–1941.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735–743.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al.** 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* **316**, 1030–1033.
- Deal RB, Kandasamy MK, McKinney EC, Meagher RB.** 2005. The nuclear actin-related protein ARP6 is a pleiotropic developmental regulator required for the maintenance of *FLOWERING LOCUS C* expression and repression of flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**, 2633–2646.
- Deal RB, Topp CN, McKinney EC, Meagher RB.** 2007. Repression of flowering in Arabidopsis requires activation of *FLOWERING LOCUS C* expression by the histone variant H2A.Z. *The Plant Cell* **19**, 74–83.
- Gazzani S, Gendall AR, Lister C, Dean C.** 2003. Analysis of the molecular basis of flowering time variation in Arabidopsis accessions. *Plant Physiology* **132**, 1107–1114.
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C.** 2001. The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. *Cell* **107**, 525–535.
- Gomez-Mena C, Pineiro M, Franco-Zorrilla JM, Salinas J, Coupland G, Martinez-Zapater JM.** 2001. *early bolting in short days*: an Arabidopsis mutation that causes early flowering and partially suppresses the floral phenotype of leafy. *The Plant Cell* **13**, 1011–1024.
- Guillemette B, Bataille AR, Gevry N, Adam M, Blanchette M, Robert F, Gaudreau L.** 2005. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biology* **3**, E384.
- Gupta V, Khurana R, Tyagi AK.** 2007. Promoters of two anther-specific genes confer organ-specific gene expression in a stage-specific manner in transgenic systems. *Plant Cell Reports* **26**, 1919–1931.
- He Y, Amasino RM.** 2005. Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends in Plant Science* **10**, 30–35.
- He Y, Doyle MR, Amasino RM.** 2004. PAF1-complex-mediated histone methylation of *FLOWERING LOCUS C* chromatin is required for the vernalization-responsive, winter-annual habit in Arabidopsis. *Genes and Development* **18**, 2774–2784.
- He Y, Michaels SD, Amasino RM.** 2003. Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. *Science* **302**, 1751–1754.
- Imaizumi T, Kay SA.** 2006. Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in Plant Science* **11**, 550–558.
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C.** 2000. Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**, 344–347.
- Kim SY, He Y, Jacob Y, Noh YS, Michaels S, Amasino R.** 2005. Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in Arabidopsis requires a putative histone H3 methyl transferase. *The Plant Cell* **17**, 3301–3310.
- Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD, Rine J.** 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biology* **2**, 587–599.
- Krichevsky A, Gutgarts H, Kozlovsky SV, Tzfira T, Sutton A, Sternglanz R, Mandel G, Citovsky V.** 2007. C2H2 zinc finger-SET histone methyltransferase is a plant-specific chromatin modifier. *Developmental Biology* **303**, 259–269.
- Krogan NJ, Baetz K, Keogh MC, et al.** 2004. Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**, 13513–13518.
- Krogan NJ, Keogh MC, Datta N, et al.** 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular Cell* **12**, 1565–1576.
- Lee I, Amasino RM.** 1995. Effect of vernalization, photoperiod, and light quality on the flowering phenotype of Arabidopsis plants containing the *FRIGIDA* gene. *Plant Physiology* **108**, 157–162.
- Lee MG, Wynder C, Bochar DA, Hakimi MA, Cooch N, Shiekhhattar R.** 2006. Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 6395–6402.
- Li B, Pattenden SG, Lee D, Gutierrez J, Chen J, Seidel C, Gerton J, Workman JL.** 2005. Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 18385–18390.
- March-Diaz R, Garcia-Dominguez M, Florencio FJ, Reyes JC.** 2007. SEF, a new protein required for flowering repression in Arabidopsis, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiology* **143**, 893–901.
- Martin-Trillo M, Lazaro A, Poethig RS, Gomez-Mena C, Pineiro MA, Martinez-Zapater JM, Jarillo JA.** 2006. *EARLY IN SHORT DAYS 1 (ESD1)* encodes ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (AtARP6), a putative component of chromatin remodeling complexes that positively regulates *FLC* accumulation in Arabidopsis. *Development* **133**, 1241–1252.
- Michaels SD, Amasino RM.** 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell* **11**, 949–956.
- Michaels SD, Amasino RM.** 2000. Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant, Cell and Environment* **23**, 1145–1154.
- Michaels SD, Amasino RM.** 2001. Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *The Plant Cell* **13**, 935–941.
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C.** 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343–348.
- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I.** 2003. The *SOC1* MADS-box gene integrates

- vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal* **35**, 613–623.
- Mueller CL, Jaehning JA.** 2002. Ctr9, Rtf1 and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 1971–1980.
- Noh YS, Amasino RM.** 2003. *PIE1*, an *ISWI* family gene, is required for *FLC* activation and floral repression in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**, 1671–1682.
- Oh S, Zhang H, Ludwig P, van Nocker S.** 2004. A mechanism related to the yeast transcriptional regulator Paf1c is required for expression of the Arabidopsis *FLC/MAF* MADS box gene family. *The Plant Cell* **16**, 2940–2953.
- Owen-Hughes T, Bruno M.** 2004. Breaking the silence. *Nature* **303**, 324–325.
- Piñero M, Gomez-Mena C, Schaffer R, Martinez-Zapater JM, Coupland G.** 2003. *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS* is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in Arabidopsis by repressing *FT*. *The Plant Cell* **15**, 1552–1562.
- Raisner RM, Hartley PD, Meneghini MD, Bao MZ, Liu CL, Schreiber SL, Rando OJ, Madhani HD.** 2005. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**, 233–248.
- Raisner RM, Madhani HD.** 2006. Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Current Opinion in Genetics and Development* **16**, 119–124.
- Ratcliffe OJ, Kumimoto RW, Wong BJ, Riechmann JL.** 2003. Analysis of the Arabidopsis *MADS AFFECTING FLOWERING* gene family: *MAF2* prevents vernalization by short periods of cold. *The Plant Cell* **15**, 1159–1169.
- Reeves PH, Murtas G, Dash S, Coupland G.** 2002. *Early in short days 4*, a mutation in Arabidopsis that causes early flowering and reduces the mRNA abundance of the floral repressor *FLC*. *Development* **129**, 5349–5361.
- Reyes JC.** 2006. Chromatin modifiers that control plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 21–27.
- Santisteban MS, Kalashnikova T, Smith MM.** 2000. Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* **103**, 411–422.
- Schmitz RJ, Amasino RM.** 2007. Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1769**, 269–275.
- Scortecchi KC, Michaels SD, Amasino RM.** 2001. Identification of a MADS-box gene, *FLOWERING LOCUS M*, that represses flowering. *The Plant Journal* **26**, 229–236.
- Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, Amasino RA, Coupland G.** 2006. The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes and Development* **20**, 898–912.
- Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES.** 1999. The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *The Plant Cell* **11**, 445–458.
- Sheldon CC, Conn AB, Dennis ES, Peacock WJ.** 2002. Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression. *The Plant Cell* **14**, 2527–2537.
- Shindo C, Aranzana MJ, Lister C, Baxter C, Nicholls C, Nordborg M, Dean C.** 2005. Role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* in determining variation in flowering time of Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**, 1163–1173.
- Squazzo SL, Costa PJ, Lindstrom DL, Kumer KE, Simic R, Jeennings JL, Link AJ, Arndt KM, Hartzog GA.** 2002. The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors *in vivo*. *EMBO Journal* **21**, 1764–1774.
- Sung S, Amasino RM.** 2004. Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**, 159–164.
- Sung S, Amasino RM.** 2006. Molecular genetic studies of the memory of winter. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3369–3377.
- Sung S, Schmitz RJ, Amasino RM.** 2006. A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis. *Genes and Development* **20**, 3244–3248.
- Telfer A, Bollman KM, Poethig RS.** 1997. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 645–654.
- Werner JD, Borevitz JO, Warthmann N, Trainer GT, Ecker JR, Chory J, Weigel D.** 2005. Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an *FLM* deletion as a cause for natural flowering-time variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**, 2460–2465.
- Wilson RN, Heckman JW, Somerville CR.** 1992. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiology* **100**, 403–408.
- Wood CC, Robertson M, Tanner G, Peacock WJ, Dennis ES, Helliwell CA.** 2006. The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a Polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **103**, 14631–14636.
- Wu WH, Alami S, Luk E, Wu CH, Sen S, Mizuguchi G, Wei D, Wu C.** 2005. Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nature Structural and Molecular Biology* **12**, 1064–1071.
- Zhang H, Roberts DN, Cairns BR.** 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**, 219–231.
- Zhao Z, Yu Y, Meyer D, Wu C, Shen WH.** 2005. Prevention of early flowering by expression of *FLOWERING LOCUS C* requires methylation of histone H3 K36. *Nature Cell Biology* **7**, 1256–1260.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W.** 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**, 2621–2632.



## Review. Photoperiodic control of flowering time

J. A. Jarillo\*, I. del Olmo, A. Gómez-Zambrano, A. Lázaro,  
L. López-González, E. Miguel, L. Narro-Diego, D. Sáez and M. Piñeiro

*Departamento de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).  
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) INIA-UPM.  
Ctra. A Coruña, km 7,5. 28040 Madrid. Spain*

---

### Abstract

The rotation of the earth results in periodic changes in environmental factors such as daylength and temperature; the circadian clock is the endogenous mechanism responsible for day-length measurement, and allows plants to anticipate these fluctuations and modulate their developmental programs to maximize adaptation to those environmental cues. Flowering represents the transition from a vegetative to reproductive phase and is controlled by complex and highly regulated genetic pathways. In many plants, the time of flowering is strongly influenced by photoperiod, which synchronizes the floral transition with the favourable season of the year. Over the last decade, genetic approaches have aided the discovery of many signalling components involved in the photoperiod pathway and here, we highlight the significant progress made in identifying the molecular mechanisms that measure daylength and control flowering initiation in *Arabidopsis*, a long day (LD) plant, and in rice, a short day (SD) plant. Some components of the *Arabidopsis* regulatory network are conserved in other species, but the difference in the function of particular genes may contribute to the opposite photoperiodic flowering response observed between LD and SD plants. The specific regulatory mechanisms involved in controlling *CONSTANS* (CO) expression and stability by the circadian clock and the different photoreceptors will be described. In addition, the role of *FLOWERING LOCUS T* (FT), as part of the florigen, and several other light signalling and circadian-dependent components in photoperiodic flowering will be also discussed.

**Additional key words:** circadian clock, *CONSTANS*, florigen, *FT*, photoperiodism, photoreceptors.

### Resumen

#### Revisión. Control fotoperiódico del tiempo de floración

La rotación diaria de la tierra provoca cambios periódicos en la duración del día o en la temperatura, y el reloj circadiano es un mecanismo endógeno responsable de la medida de la duración del día; este oscilador molecular permite a los organismos anticiparse a dichos cambios y adaptar su desarrollo de manera adecuada. La floración representa la transición desde una fase vegetativa del crecimiento a una reproductiva, y está controlada por diferentes rutas, muy complejas y altamente reguladas. En muchas plantas, esta transición está controlada principalmente por la duración del día o fotoperiodo, el cual sincroniza la floración con la estación más favorable del año. En la última década, diferentes estudios genéticos han facilitado la caracterización de muchos componentes de señalización involucrados en la ruta del fotoperiodo y en esta revisión se discute el progreso reciente que se ha llevado a cabo en la identificación de los mecanismos moleculares que permiten medir la duración del día, y que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis*, una especie de día largo, y en arroz, un especie de día corto. Aunque los componentes de las rutas reguladoras de *Arabidopsis* parecen conservarse en otras especies, la diferencia de función de genes concretos parece contribuir a la respuesta opuesta a la duración del día observada entre especies de día largo y de día corto. Se describen los mecanismos reguladores específicos que participan en la expresión y estabilidad de *CONSTANS* (CO) por el reloj circadiano y por diferentes fotorreceptores. Además, también discutiremos el papel del locus *FLOWERING LOCUS T* (FT), como parte del florigeno, y de otros componentes dependientes del mecanismo del reloj circadiano o de la señalización por luz en el control por fotoperiodo del tiempo de floración.

**Palabras clave adicionales:** *CONSTANS*, florigeno, fotoperiodismo, fotorreceptores, *FT*, reloj circadiano.

---

\* Corresponding author: [jarillo@inia.es](mailto:jarillo@inia.es)

Received: 11-10-07; Accepted: 30-01-08.

## Introduction<sup>1</sup>

The question of how plants monitor environmental cues and trigger the initiation of flowering at the right season has attracted the interest of plant biologists for decades. The duration of daylight changes with a predictable pattern along the year, providing a reliable environmental signal for the varying seasons. The ability to sense and respond to changes in daylength is known as photoperiodism, and is a widespread phenomenon found in both plants and animals that allows these organisms to adapt to seasonal changes in their environment. The importance of daylength in controlling seasonal responses was already proposed by Tournois and Klebs back in the early 1900's; these researchers working independently suggested that the duration rather than the quantity of light is a major determinant in plant development (Tournois, 1912, 1914; Klebs, 1913). However, it was Garner and Allard (1920) that, using controlled photoperiodic conditions, showed for the first time that daylength can determine the time of flowering, being the first photoperiodism phenomenon documented. Their studies on soybean and tobacco led to the proposal that flowering would only occur if the duration of the daily light period was sufficiently short. These authors classified plants into three photoperiodic groups according to their flowering response to daylength. In long day (LD) plants flowering is promoted by daily periods of light longer than a critical daylength, whereas plants that accelerate flowering in response to daylength below a critical threshold are called short day (SD) plants. Day-neutral (DN) plants flower at the same time irrespectively of the photoperiodic conditions.

Following these and other observations that established the central role of daylength perception in controlling plant development, several models have attempted to explain the basis of the photoperiodic responses. A first simple model proposed that the gradual accumulation

of a substance is required to trigger a physiological response; the amount of this chemical can increase up to a threshold level only in photoperiodic inductive conditions. For instance, in the case of photoperiodic flowering, increasing the length of darkness should either promote (in SD plants) or inhibit (in LD plants) the accumulation of a product that results in flowering induction. According to this hourglass model, once a threshold duration is reached, further increments should have no consequences on flowering; however, the analysis of the floral responses of many plant species to cycles of 8 h of light and increasing hours of darkness provides strong evidence for the involvement of the circadian system in the measurement of photoperiodic time. In contrast to the prediction of the hourglass model, the floral response fluctuates rhythmically under these conditions, and a maximum response is achieved every time the total length is 24 h or a multiple of it, whereas at intermediate cycle lengths the response is much lower (Thomas and Vince-Prue, 1997). Therefore, it would be the presence or absence of light at specific times of the day rather than the duration of the periods of light or darkness that is important for photoperiodic responses. The effect on flowering of night-breaks is consistent with this view; pulses of light during the night period can effectively prevent flowering of SD plants and this floral response follows circadian rhythms. These observations strongly support the clock hypothesis postulated by Bünning (1936), who proposed more than seventy years ago that the mechanism controlling daily movements in leaves or petals, subsequently named the circadian clock, was also the basis of photoperiodic time measurement. This circadian clock generates a rhythm with a period close to 24 h and is responsive to light only at a particular phase of the cycle. When a plant displaying a photoperiodic flowering response is grown under a daylength regime that causes it to be exposed to light at this particular phase, flowering is

<sup>1</sup> Abbreviations used: *AP* (*APETALA*), bHLH (basic helix-loop-helix), *CCA* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED*), CDF (*CYCLING DOF FACTOR*), CK (casein kinase), *CO* (*CONSTANS*), COP (*CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC*), CRY (*CRYPTOCHROMES*), DET (*DE-ETIOLATED*), DN (day-neutral), EE (evening element), Ehd (early heading date), *ELF* (*EARLY FLOWERING*), EST (expressed sequence tag), *FHY* (*FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL*), FKF (FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX), *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), FMN (FLAVIN MONONUCLEOTIDE), *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), *Hd* (*Heading-date*), GI (*GIGANTEA*), LD (long day), *LHY* (*LONG ELONGATED HYPOCOTYL*), LKP (LOV KELCH PROTEIN), *LUX* (*LUX ARRHYTHMO*), miRNA (microRNA), PAS (PERIOD-CIRCADIAN-PROTEIN/AH-RECEPTOR-NUCLEAR-TRANSLOCATOR-PROTEIN/SINGLE-MINDED-PROTEIN), PFT (PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME), PHOT (PHOTOTROPIN), PHY (PHYTOCHROME), PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR), PIL (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR-LIKE), PRR (pseudo-response regulator), QTL (quantitative trait loci), RFI (RED AND FAR-RED INSENSITIVE), RVE (REVEILLE), SAM (shoot apical meristem), SD (short day), *SFT* (*SINGLE FLOWER TRUSS*), SOC (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS), *SPA* (*SUPPRESSOR OF PHYA*), *SRR* (*SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED*), *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*), *TIC* (*TIME FOR COFFEE*), TOC (TIMING OF CAB EXPRESSION), *TSF* (*TWIN SISTER OF FT*), ZTL (ZEITLUPE).

induced if the plant shows a LD response, or repressed in the case of a SD plant. A number of years later, Pittendrigh, working on insects, introduced a new turn in Bünning's postulates and proposed the external coincidence model that includes the role of light in entraining the clock to the solar cycle to explain photoperiodic responses (Bünning, 1960; Pittendrigh and Minis, 1964). Recent studies addressing the photoperiodic control of flowering have provided strong support for the external coincidence hypothesis and molecular components of the mechanism responsible for daylength discrimination have been identified (reviewed in Yanovsky and Kay, 2003; Searle and Coupland, 2004; Corbesier and Coupland, 2005; Baurle and Dean, 2006; Imaizumi and Kay, 2006; Jarillo and Piñeiro, 2006).

Besides these observations concerning the time-keeping mechanism, a crucial finding in the understanding of the photoperiodic regulation of flowering was the identification of leaves as the site of daylength perception. Since photoperiod is measured in the leaves but the flowering response is evoked in distal meristems, the existence of a mobile signal termed the «florigen» was postulated (Chailakhyan, 1936a,b, 1937). This florigen was defined as a graft-transmissible substance(s) that is generated in the leaves in response to photoperiodic inductive conditions and moves through the phloem to stimulate the initiation of flowering in the shoot apical meristem (SAM). The florigen was proposed to be a universal signal that could induce flowering in grafts of different species, even if they display diverse photoperiodic responses. The nature of this substance has remained elusive for decades, despite the effort dedicated to its characterization.

In this review we discuss recent progress in identifying components involved in regulating the photoperiodic control of flowering; much of these advances come from analyses performed in the model species *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), a LD plant, and rice (*Oryza sativa*), a SD plant (Yanovsky and Kay, 2003; Hayama and Coupland, 2004; Searle and Coupland, 2004; Corbesier and Coupland, 2005; Imaizumi and Kay, 2006). The molecular mechanisms underlying the photoperiodic responses in other plant species have been poorly characterized; only how the flowering response to daylength is achieved in plants such as tomato (*Solanum lycopersicum*) and *Pharbitis nil* has begun to be analyzed and is briefly summarised (Hayama *et al.*, 2007; Mizoguchi *et al.*, 2007). We discuss recent data related to the specific regulatory mechanisms controlling *CONSTANS* (*CO*) expression and stability

by the circadian clock and several photoreceptors, and that provide the molecular basis for our current understanding of the external coincidence model in the control of photoperiodic flowering (Yanovsky and Kay, 2002; Valverde *et al.*, 2004; Imaizumi *et al.*, 2005; Sawa *et al.*, 2007). We also describe the involvement of the floral integrator *FT* (*FLOWERING LOCUST*) in this process, as well as its proposed role as an essential component of the florigen (Lifschitz *et al.*, 2006; Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Kobayashi and Weigel, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007). Finally, we depict other light signalling and circadian-dependent proteins that participate in the regulation of photoperiodic flowering.

## The circadian system in photoperiodic flowering

Daylength measurement depends on the ability of plants to detect light and the existence of a timekeeping mechanism referred to as the circadian clock. As in other organisms, the plant circadian system consists of input pathways that provide temporal information to the clock, the central oscillator mechanism itself, responsible for driving rhythms with a period close to 24 h, and a number of output pathways that regulate metabolic and developmental processes using the temporal information provided by the clock; the participation of the circadian clock in the control of biological activities allows plant species to anticipate and adapt to periodic environmental changes, maximizing their opportunities to survive successfully (Mas, 2005; McClung, 2006; Hotta *et al.*, 2007) (Fig. 1). The control of flowering by daylength is a key determinant of seasonal patterns of flowering, and is a process regulated by one or more of these output branches of the clock. To measure daylength and achieve this photoperiodic regulation, the core oscillator determines the daily rhythms in output genes, and these can set the light sensitive phase for triggering the floral transition when plants are exposed to appropriate photoperiodic conditions.

### Light perception and entrainment of the circadian clock

Light is perceived by photoreceptors and represents the main input pathway to the clock; the pace of the clock is reset by light every day allowing the progressive

adjustment of the clock to the time of dawn, so that the mechanism of the oscillator remains synchronized with external cycles of light and dark (Franklin *et al.*, 2005; Jiao *et al.*, 2007). Plants have evolved an array of photoreceptors to detect light over a large range of fluence rates and wavelengths, including the PHYTOCHROMES (PHY), which absorb in the red and far-red region of the spectrum, and the CRYPTOCHROMES (CRY), PHOTOTROPINS (PHOT), and the ZEITLUPE (ZTL)/LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2)/FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1) family, all of which absorb blue and UV-A light (Yanovsky and Kay, 2003; Jiao *et al.*, 2007).

### Phytochromes

In higher plants PHYs constitute families with both distinct and overlapping functions in light perception (Quail, 2002). Arabidopsis contains five PHYs (A-E) with PHYA playing the most prominent role in LD perception. In fact *phyA* mutants show a flowering delay when grown in SD conditions that are extended for several hours with incandescent light, enriched in far-red light that promotes flowering (Johnson *et al.*, 1994). By contrast, red light-responsive phytochromes in Arabidopsis only have secondary roles in the photoperiodic regulation of flowering time, and in fact, Arabidopsis wild type plants do not discriminate SD from LD under red light (Mockler *et al.*, 2003). However, PHYB contributes to daylength perception in Arabidopsis through its interaction with PHYA and CRY2 (Mockler *et al.*, 2003). In contrast to Arabidopsis, rice *phyA* mutants do not display significant alterations in flowering time (Takano *et al.*, 2001), whereas mutations in either rice *phyB* or *phyC* cause moderate early flowering under LD conditions (Ishikawa *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2005). However, *phyA* mutations, in combination with *phyB* or *phyC*, caused dramatic early flowering of double mutant plants (Takano *et al.*, 2005), suggesting that these phytochromes are the main photoperiodic photoreceptors in rice. Consistent with this, rice *se5* mutant, affected in the biosynthesis of the phytochrome chromophore, is insensitive to photoperiod and flower early in all photoperiodic conditions (Izawa *et al.*, 2000). Intriguingly, in tomato no flowering phenotypes have been associated with mutations affecting *PHY* genes, even though flowering in this species is affected by light intensity and at certain point by photoperiod (Samach and Lotan, 2007).

The activity of phytochromes is crucial for the light-mediated entrainment of the clock (Fig. 1). Arabidopsis *phy* mutants have a normal clock function under continuous dark, excluding a direct effect of these photoreceptors on the oscillator (Devlin and Kay, 2000). Single and multiple combinations of Arabidopsis *phy* mutants analyses in red, far-red or blue lights showed that the loss of one or more photoreceptors caused a lengthening in the period of the clock and suggest partially overlapping roles for different PHYs in clock entrainment (Somers *et al.*, 1998a; Devlin and Kay, 2000).

The phytochrome-dependent input pathway to the clock may be mediated through interaction with basic helix-loop-helix (bHLH) proteins such as PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3). Irradiation of Arabidopsis plants with red light induces the binding of phytochrome to PIF3, whereas a pulse of far-red light releases phytochrome from the complex (Ni *et al.*, 1999). PIF3 binds to a G-box sequence motif present in the promoters of two central components of the clock, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* and *LONG ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, inducing their transcription. Indeed, the induction of *CCA1* and *LHY* was reduced in transgenic plants expressing *PIF3* antisense RNA (Martínez-García *et al.*, 2000). The lack of circadian defects in *pif3* mutants could be accounted for by other members of the PIF family such as PIF4 (Huq and Quail, 2002) and PIF5/PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR-LIKE 6 (PIL6) (Fujimori *et al.*, 2004; Nozue *et al.*, 2007), that might have redundant functions in the light signal transduction to the clock and compensate for the loss of *PIF3* function. However, the absence of circadian alterations in *PIF3* antisense and *PIF3* overexpression lines (Kim *et al.*, 2003a; Monte *et al.*, 2004; Oda *et al.*, 2004; Viczian *et al.*, 2005) poses a question on a direct role for PIF3 in the oscillator, although it might still modulate the light input to the clock. In addition, some PIF/PIL proteins can also interact with TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1/PRR1), an Arabidopsis pseudo-response regulator (PRR) whose central role on clock function will be discussed in the following section (Yamashino *et al.*, 2003; Fujimori *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2007). TOC1 and PIF/PIL interactions may occur at the *CCA1* and *LHY* promoters, enhancing their expression in a light-dependent fashion.

Mutations in *SENSITIVITY TO RED LIGHT REDUCED 1 (SRR1)*, another PHYB signalling pathway component, cause a number of circadian defects such as shortening of the period of leaf movement and *TOC1*



and *CCA1* expression (Staiger *et al.*, 2003), as well as early flowering and long hypocotyl in red light (Hall *et al.*, 2002; Staiger *et al.*, 2003). Because SRR1 protein does not interact directly with PHYB, other components must lie between them.

*FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 (FHY1)* and *FHY3*, related to PHYA signalling, are required for phase shifting of leaf movement in response to far-red light (Yanovsky *et al.*, 2001). *FHY3* was also associated with the gating of PHY signalling into the circadian clock (Allen *et al.*, 2006). Furthermore, mutations in *SUPPRESSOR OF PHYA1 (SPA1)* led to a reduction in the free-running period of *TOC1* and *CCA1* expression (Ishikawa *et al.*, 2006).

Light may also signal to the oscillator through *DETIOLATED1 (DET1)* (Song and Carre, 2005), and *CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)* (Ma *et al.*, 2003), negative regulators of PHY and CRY signalling. Mutations in *DET1* and *COP1* genes cause reduced circadian period, possibly through the inhibition of LHY degradation (Song and Carre, 2005).

### Blue light receptors

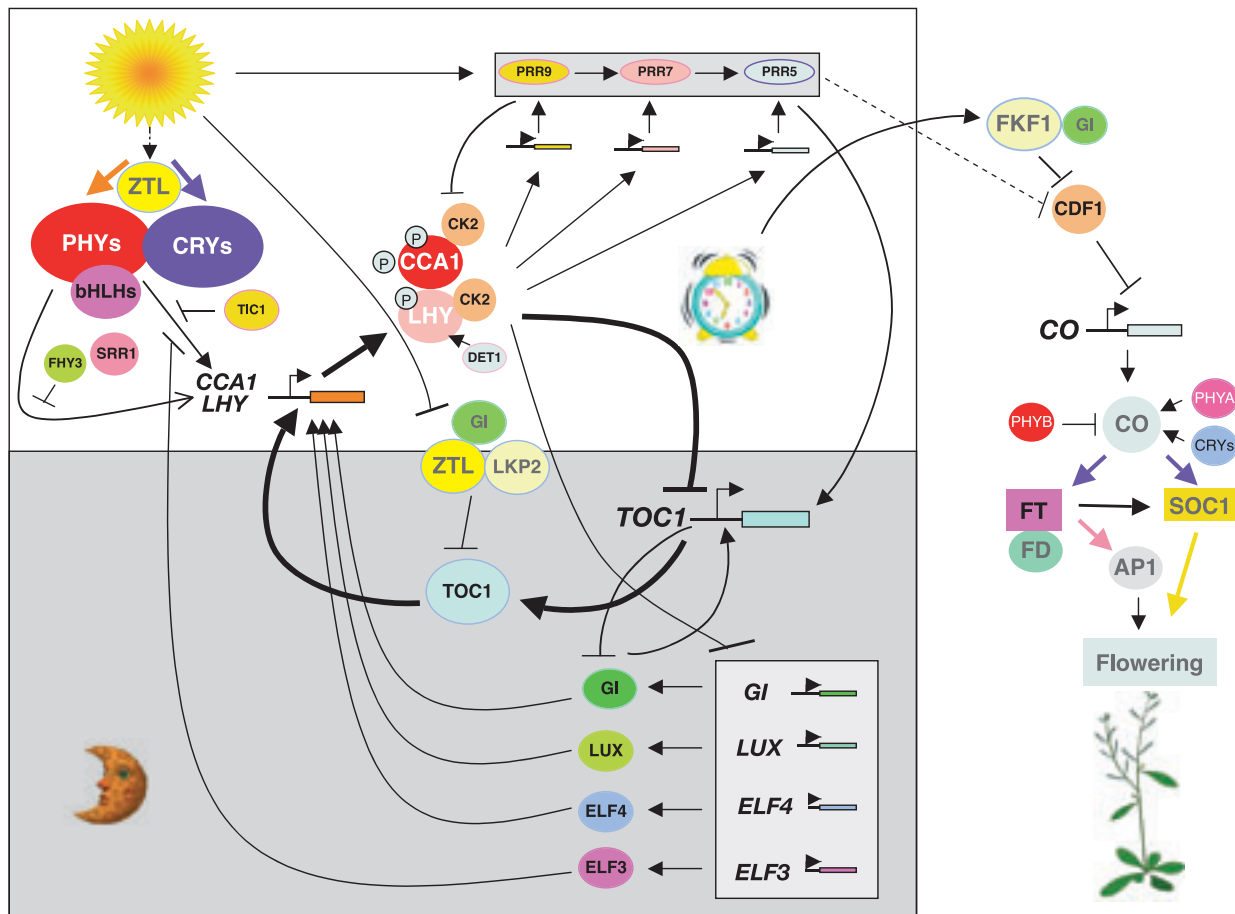
Blue light promotes flowering in Arabidopsis (Goto *et al.*, 1991), and *CRY2* regulates flowering time redundantly with *CRY1* and PHYA under these conditions (Lin and Shalitin, 2003; Mockler *et al.*, 2003). Associations between PHYs and CRYs are supported by functional interactions (Ahmad *et al.*, 1998; Mas *et al.*, 2000), and in fact, *CRY2* binds physically to PHYB antagonizing its inhibitory effect on flowering initiation (Mockler *et al.*, 1999; Mas *et al.*, 2000). Both *CRY1* and *CRY2* have partially overlapping functions in clock entrainment (Somers, 2005), and *CRY1* may also act downstream of PHYA in red light signalling (Devlin and Kay, 2001). Double mutants *cry1 cry2* still show robust rhythmicity (Devlin and Kay, 2000), indicating that cryptochromes do not form a part of the central circadian oscillator in plants as they do in mammals (Cashmore, 2003). Because a quadruple photoreceptor mutant of *cry1 cry2 phyA phyB* still keeps track of time and retains circadian rhythmicity (Yanovsky *et al.*, 2000), it is possible that photoreceptors like PHYC, PHYD and PHYE or ZTL and ZTL-like proteins may provide light input to the clock (Imaizumi *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007a; Sawa *et al.*, 2007).

In rice, three cryptochromes, OsCRY1a, OsCRY1b and OsCRY2, have been identified and only the latter

is involved in the promotion of flowering time (Hirose *et al.*, 2006). In tomato, overexpression or silencing of *CRY2* had no effect on the developmental timing of the transition to flowering, although the rate of leaf production was altered causing a delayed appearance of flowers (Giliberto *et al.*, 2005).

ZTL/LKP2/FKF1 proteins, another family of blue light receptors, are also involved in the control of flowering time and circadian rhythms in Arabidopsis (Nelson *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2000; Jarillo *et al.*, 2001; Schultz *et al.*, 2001; Imaizumi *et al.*, 2003). All three proteins bear a PAS/LOV domain that binds FMN (Imaizumi *et al.*, 2003), an F-box domain devoted to recruit proteins for ubiquitination and target them for subsequent degradation (Han *et al.*, 2004), and six kelch repeats mediating the establishment of interactions between proteins. Phototropins contain a chromophore binding domain very similar to the PAS signal-sensor motif present in ZTL/LKP2/FKF1, but in contrast to these, they do not appear to have a role in the control of flowering time (Christie, 2007).

*ztl* mutants show an array of defects on circadian rhythmicity and clock-controlled gene expression, flowering late only under LD (Nelson *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2000; Jarillo *et al.*, 2001; Imaizumi *et al.*, 2003; Kevei *et al.*, 2006). Although ZTL mRNA is constitutively expressed, ZTL protein levels show a daily pattern of oscillation (Kim *et al.*, 2003c), and this rhythmic expression of ZTL is necessary to sustain a normal circadian period by controlling the proteasome-dependent degradation of TOC1 (Somers *et al.*, 2000; Mas *et al.*, 2003b; Han *et al.*, 2004). TOC1 also interacts with PRR3, modulating TOC1 stability by hindering ZTL-dependent TOC1 degradation (Para *et al.*, 2007). However the degradation of TOC1 is not sufficient to explain the *ztl* phenotypes, and in fact, ZTL also targets the TOC1 homologue PRR5 for degradation (Kiba *et al.*, 2007). These observations, together with the ability of ZTL to bind PHY and CRY (Jarillo *et al.*, 2001), argue for a role of ZTL in the light input to the clock. GIGANTEA (GI), another clock-component (Fowler *et al.*, 1999), is essential to establish and sustain oscillations of ZTL by a direct protein-protein interaction (Kim *et al.*, 2007a). GI stabilizes ZTL *in vivo* and the ZTL-GI interaction through the LOV domain of ZTL is strongly enhanced by blue light. Notably, a mutation in the LOV domain eliminates blue-light-enhanced binding of GI to ZTL. These data are consistent with a function of ZTL as a blue-light photoreceptor, which facilitates its own stability through a blue-light-enhanced GI inter-



**Figure 1.** Clock-controlled photoperiodic induction of flowering in Arabidopsis. CO promotes flowering in response to LD mediating the control of flowering by the circadian clock. Phytochromes and cryptochromes entrain and condition the negative-feedback loop that comprises the central oscillator. ZTL family of proteins may also act as blue light photoreceptors, using the LOV domain as a flavin binding site, and mediating the effects of light/dark cycles on the phase and period of the circadian clock. Light input to the clock via phytochrome may occur through complexes with bHLHs, such as PIF factors, which bind to a G-box motif in *CCA1* and *LHY* promoters. SRR1, a PHYB signalling pathway component, has also effects on the clock. Different proteins such as ELF3, TIC1 and FHY3 act as clock-gated negative regulators of light input to the clock.

A reciprocal regulation between TOC1 and CCA1/LHY defined the first basic loop for the clock mechanism in Arabidopsis. When CCA1/LHY levels fall late in the day, TOC1 may activate the transcription of *CCA1/LHY*, thus forming the outline of a transcriptional feedback loop highlighted with thick lines. CCA1 and LHY are phosphorylated by CK2, which may make them substrates for the SCF complex and target them for degradation by the proteasome. Light may also signal to the oscillator through DET1 regulating LHY degradation. LHY/CCA1 also act as negative regulators of *ELF3*, *ELF4*, *LUX* and *GI*, which positively regulate the transcription of *LHY/CCA1*. ZTL, and possibly LKP2, target TOC1 and PRR5 for degradation via the ubiquitin system, playing some role in protein turnover of clock-associated components. GI is essential to establish and sustain oscillations of ZTL by a direct protein-protein interaction. At least two other loops are thought to interlock with the CCA1/LHY/TOC1 loop. In the first one, *TOC1* may be activated by a hypothetical evening-expressed protein that itself is repressed by TOC1 and suggested that may be GI. PPR5, PPR7 and PPR9 proteins, also regulated positively by CCA1 and LHY, may close another regulatory feedback loop. Shaded area indicates activities peaking in the subjective night, and white area indicates activities peaking during the subjective day.

Clock-controlled expression of genes involved in the light signalling pathways and flowering-time regulation provide the organism with the ability to anticipate and adapt to periodic changes in the environment. The initiation of flowering begins when CO expression coincides with light. FKF1 is required to increase CO transcription at dusk, controlling the stability of CDF1, which is a repressor of CO expression, providing a mechanistic view of how the coincidence of light with circadian timing regulates photoperiodic flowering. PRR9, PRR7 and PRR5 activate CO expression during the daytime predominantly by repressing CDF1 repressor. Blue and far-red lights stabilize CO through PHYA and CRY2, whereas red light acting through PHYB destabilizes the protein. Active CO protein can directly increase expression of the *FT* and *SOC1* genes, promoting the transition to flowering. FT protein, as part of the florigen, is transported to the SAM where interacts with FD to induce the expression of *API*, that play a pivotal role in specifying floral meristems during the floral transition.

action. The cycling of GI protein may confer a post-translational rhythm on ZTL protein. This mechanism of establishing and sustaining robust oscillations of ZTL results in the high-amplitude TOC1 rhythms necessary for proper clock function (Kim *et al.*, 2007a).

The over-expression of *LKP2* gene also provokes a number of circadian alterations, suggesting that this protein may function within or close to the circadian clock (Schultz *et al.*, 2001). In fact, this protein may have a similar function to ZTL in mediating TOC1 degradation since *LKP2* interacts with both Skp1-like proteins and TOC1 (Yasuhara *et al.*, 2004). The potential redundancy of ZTL and *LKP2* is underscored by the fact that neither *ztl* nor *lkp2* mutants are arrhythmic, whereas plants overexpressing either ZTL or *LKP2* are, presumably due to increased degradation of TOC1 (Somers *et al.*, 2004). The *ztl lkp2* double mutant has a phenotype similar to that of *ztl*, suggesting that the effects of *lkp2* on circadian function are subtle (Somers, 2005).

The third member of this family, FKF1, is structurally quite similar to ZTL and *LKP2* but, in contrast to *ztl*, the *fkf1* mutant has a weaker effect on circadian clock regulation (Nelson *et al.*, 2000). FKF1 appears to function in the regulation of flowering time as we will discuss in the next section. *FKF1* mRNA is itself clearly circadian clock-regulated, peaking towards the end of the day (Imaizumi *et al.*, 2003). FKF1 has been implicated in a mechanism that activates *CO* expression by light, controlling the stability of CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1), which is a repressor of *CO* transcription (see section «Photoperiodic induction of flowering in Arabidopsis» below; Imaizumi *et al.*, 2005).

Therefore, both light-labile CRY2 and PHYA together with FKF1 seem to be the most important photoreceptors discriminating day and night in Arabidopsis (Fig. 1); their combined ability to detect the wide range of light qualities that exist in nature might ensure the correct onset of plant developmental programs that rely on light perception. Photoreceptors mediate light input to the clock, but they are themselves regulated by the clock, creating regulatory feedback loops that play a central role in the circadian gating of photic signals to the clock (Fig. 1). In addition, light can also regulate the expression of clock genes such as *CCA1*, *LHY*, *GI*, *ELF4*, *PRR9*, etc (Wang *et al.*, 1997; Matsushika *et al.*, 2000, 2002; Tepperman *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003b; Farre *et al.*, 2005; Kikis *et al.*, 2005; Locke *et al.*, 2005b), or the accumulation of clock proteins by modulating their translation as in the case of *LHY* and *PRR7* that display light-dependent daily rhythms (Kim *et al.*,

2003b; Farré and Kay, 2007); the stability of clock components that can be targeted for degradation, as it occurs with TOC1 and ZTL proteins, may also be influenced by light (Mas *et al.*, 2003b; Kim *et al.*, 2007a). TOC1 protein levels are constantly elevated in *ztl*, consistent with a role for ZTL in the degradation of TOC1, and the interaction between these proteins (Mas *et al.*, 2003b) has been proposed to be regulated by light, making photo-activated ZTL unable to get in contact with TOC1. A blue-light-enhanced GI interaction with ZTL may be essential to establish and sustain oscillations of this protein (Kim *et al.*, 2007a).

### Central oscillators

The rhythmic behaviour of the circadian clock resides in an endogenous oscillator with a period length close to 24 h that can be entrained to daily oscillations in light and temperature (Mas, 2005; McClung, 2006; Hotta *et al.*, 2007). In plants, the circadian system is likely to consist of more than one clock. There is compelling evidence for independent oscillators in each cell. It is also possible that there are cell-specific oscillators and multiple oscillators in individual cells (see Gardner *et al.*, 2006, for a review). Genetic studies support a role for the circadian clock in a regulatory pathway involved in the control of flowering time in response to daylength in Arabidopsis. Most of the mutants isolated on the basis of their altered circadian phenotypes such as *toc1* (Somers *et al.*, 1998b), *ztl* (Somers *et al.*, 2000) and *lux arrhythmo (lux)* (Hazen *et al.*, 2005; Onai and Ishiura, 2005) also exhibit defects in the regulation of flowering time. Conversely, many mutants initially selected for their defects in photoperiodic flowering also display alterations in other output pathways of the clock as well as aberrant circadian rhythms; that is the case of *early flowering 3 (elf3)* (Hicks *et al.*, 1996), *lhy* (Schaffer *et al.*, 1998), *gi* (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999), and *elf4* (Doyle *et al.*, 2002; McWatters *et al.*, 2007).

Transcriptional feedback loops are a feature of circadian clocks both in animals and plants (Mas, 2005). Based on their circadian behaviour, two Arabidopsis transcription factors, *CCA1* and *LHY*, and the pseudo-response regulator TOC1 were proposed as core components of the clock (Fig. 1) (Schaffer *et al.*, 1998; Wang and Tobin, 1998; Strayer *et al.*, 2000; Alabadi *et al.*, 2001). *CCA1* and *LHY* fulfil required criteria for being clock components, showing circadian oscillations

of transcript and protein levels in plants kept in continuous light (Schaffer *et al.*, 1998; Wang and Tobin, 1998). In addition, plants over-expressing *CCA1* and *LHY* genes exhibited arrhythmicity as well as late flowering phenotype. Moreover, *LHY* and *CCA1* were shown to be partially redundant genes, absolutely required to sustain circadian rhythms (Green and Tobin, 1999; Alabadi *et al.*, 2002; Mizoguchi *et al.*, 2002). *CCA1/LHY*-like proteins, named REVEILLE (RVE), have been identified (Zhang *et al.*, 2007); some of them are clock-controlled genes and oscillate at both mRNA and protein levels.

On the other hand, *TOC1* integrates the environmental information to coordinate circadian responses (Mas *et al.*, 2003a). *toc1* mutations shorten the period of multiple rhythms and cause early-flowering (Millar *et al.*, 1995; Somers *et al.*, 1998b). This essential component of the oscillator is a nuclear protein containing an atypical response-regulator-receiver domain and two other motifs, the CCT and an acidic domain, suggesting a role in transcriptional regulation (Makino *et al.*, 2000; Strayer *et al.*, 2000). *TOC1* is itself circadian regulated and participates in a feedback loop to control its own expression (Strayer *et al.*, 2000) (Fig. 1). In transgenic *TOC1*-over-expressing plants, the circadian rhythm of *CAB2* expression was damped and the circadian profiles of potential clock-associated genes *CCA1*, *LHY*, *GI* and *CCR2* were all markedly altered, implicating *TOC1* as a player within, or close to, the central oscillator (Makino *et al.*, 2002). *TOC1/PRR1* and related *PRR3*, *5*, *7* and *9* genes of Arabidopsis are transcribed with a circadian rhythm and accumulate sequentially after dawn in the order *PRR9-7-5-3-TOC1*, suggesting that the *PRR* family of proteins is closely associated with circadian clock function (Matsushika *et al.*, 2000; Mizuno, 2004). The functional characterization of the *PRR* genes has been performed by analysing loss of function mutants and transgenic over-expressing lines (Mizuno, 2004; Matsushika *et al.*, 2007). Specific circadian phenotypes, such as altered rhythms under continuous light, changes in flowering time and altered sensitivity to red light during photomorphogenesis have been described for each of the *prp* mutants (Yamamoto *et al.*, 2003; Mizuno, 2004; Mizuno and Nakamichi, 2005; Matsushika *et al.*, 2007).

*TOC1* appears to positively regulate *LHY* and *CCA1* expression, whereas *LHY* and *CCA1* negatively regulate *TOC1*, and this reciprocal interaction establishes the outline of a transcriptional feedback loop initially proposed as the molecular basis for clock rhythm (Alabadi

*et al.*, 2001) (Fig. 1). *LHY/CCA1* act redundantly in the late night and early day by binding to a *TOC1* promoter region that contains a sequence over-represented in a cluster of evening-phased genes (the evening element, EE, AAATATCT), and repressing its expression (Harmer *et al.*, 2000; Alabadi *et al.*, 2001, 2002; Mizoguchi *et al.*, 2002; Harmer and Kay, 2005). In addition, recent observations indicate that *TOC1* circadian induction is accompanied by clock-controlled cycles of histone acetylation that favor transcriptionally permissive chromatin structures at the *TOC1* locus (Perales and Mas, 2007). At dawn, *TOC1* repression relies on the *in vivo* circadian binding of *CCA1*, while histone deacetylase activities facilitate the switch to repressive chromatin structures and contribute to the declining phase of *TOC1* waveform around dusk. The chromatin remodeling activities relevant at the *TOC1* locus are distinctively modulated by photoperiod, suggesting a mechanism by which the clock sets the phase of physiological and developmental outputs.

Besides the transcriptional level of regulation, daily phase specification may involve differential binding properties or phosphorylation status of clock components at distinct circadian phases or different interacting partners recruited to the promoters that modulate *CCA1/LHY/RVE* function. Interestingly, *CCA1* and *LHY* are phosphorylated *in vitro* by casein kinase 2 (CK2) (Sugano *et al.*, 1998; Sugano *et al.*, 1999; Daniel *et al.*, 2004), and this modification is necessary for their circadian oscillator function in Arabidopsis. Overexpression of CK2 regulatory subunits alters the function of the Arabidopsis clock, resulting in period shortening of genes peaking at different phase angles and reduced daylength sensitivity (Portoles and Mas, 2007).

Nevertheless, several lines of evidence suggest that the *CCA1/LHY/TOC1* model might not fully account for the complex regulation of clock function. First, *cca1 lhy* mutants are not completely arrhythmic (Alabadi *et al.*, 2002; Mizoguchi *et al.*, 2002). Moreover, rhythms in *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* expression persist in mutants constitutively overexpressing *LHY* (Hicks *et al.*, 2001). On the same way, the model cannot explain why mutations and overexpression of *TOC1* both lead to decrease in *CCA1* and *LHY* (Hayama and Coupland, 2003). Indeed, it is unclear whether *TOC1* is directly responsible for regulating *CCA1* and *LHY* expression and how this might be achieved (Hayama and Coupland, 2003; Millar, 2004). Consistent with this, modelling studies show that available data cannot be explained by a single feedback loop (Locke *et al.*, 2005a); this



may imply that other components are required for the proper functioning of the core oscillator and currently somewhat complicated interlocking multi-loop models are favourably envisaged (Gardner *et al.*, 2006; McClung, 2006). At least two other loops are thought to interlock with the *CCA1/LHY/TOC1* loop (Fig. 1). Locke *et al.* (2005b) proposed a second loop in which *TOC1* is activated by a hypothetical evening-expressed protein that itself is repressed by *TOC1* and suggested that may be *GI*. Very recently, it has been proposed that *PRR5*, *PRR7* and *PRR9*, also regulated positively by *CCA1* and *LHY*, close a third regulatory feedback loop (Farré *et al.*, 2005; Harmer and Kay, 2005; Nakamichi *et al.*, 2005a,b; Farre and Kay, 2007). *PRR5/7/9* are negative regulators of *CCA1/LHY* because *CCA1* and *LHY* transcripts accumulate in *prr7* and *prr7 prr9* mutants (Farré *et al.*, 2005), and *CCA1* is permanently transcribed in the *prr5 prr7 prr9* triple mutant (Nakamichi *et al.*, 2005b). *PRR5/7/9* and *TOC1* are thought to be mutually repressive (Mizuno and Nakamichi, 2005). Moreover, *PRR7* and *9* are partially redundant genes essential for temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock (Salomé and McClung, 2005). Emphasizing the close association of the PRRs proteins to clock function, the *prr5 prr7 prr9* triple mutant is essentially arrhythmic under all conditions tested (Nakamichi *et al.*, 2005b). However, overexpression of *PRR3*, *PRR5* and *PRR9* has only small period effects (Matsushika *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2004), suggesting that additional factors are required for full PRR function. On this way, overexpression of *PRR7* leads to severely compromised circadian rhythms (Farré and Kay, 2007). These transgenic lines display significantly reduced levels of *CCA1* and *LHY* RNA, providing further evidence for a transcriptional feedback loop between *PRR7* and these transcription factors. Altogether, these observations suggest that the Arabidopsis circadian oscillator is composed of several interlocking positive and negative feedback loops, a feature broadly conserved between fungi, plants and animals. A consistent multi-loop clock model has recently been built through mathematical simulation (Locke *et al.*, 2006; Zeilinger *et al.*, 2006).

*TOC1* is nucleus localized and has been proposed to stimulate *CCA1* and *LHY* transcription; however, evidence supporting that *TOC1* can bind DNA is still missing. The expression of *CCA1-LHY* is dependent on at least four other genes expressed with *TOC1* in the evening: *ELF3*, *ELF4*, *GI* and *LUX* (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001a; Doyle *et al.*, 2002; Hazen *et al.*, 2005; Onai and Ishiura, 2005) (Fig. 1).

Loss of function of *ELF3*, *ELF4* and *LUX* cause early flowering while plants with mutations in *GI* exhibit a late flowering phenotype.

*ELF3* binds to *PHYB* and modulates light signalling to the oscillator, acting as a clock-gated negative regulator of light input to the clock (Covington *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001a). Another gene, *TIME FOR COFFEE (TIC)*, encoding a nucleus-acting clock regulator working close to the central oscillator, may have a similar effect to *ELF3* on gating light input to the clock, although during a distinct phase (Hall *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2007). The clock in the *tic* mutants may be arrested in the subjective morning, whereas in *elf3* mutants the clock arrests in the subjective night (McWatters *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2003); indeed, a double mutant *elf3 tic* is completely arrhythmic in light and darkness, indicating that these clock components act at different circadian times.

*ELF4* is closely linked to the circadian oscillator; *elf4* mutants show similar phenotypes to those displayed by *elf3* mutants, raising the possibility that *ELF3* and *ELF4* work in close proximity in a pathway controlling clock function (Doyle *et al.*, 2002). A strong reduction of *LHY* and *CCA1* transcripts is observed in *elf4* mutants (Doyle *et al.*, 2002), whereas *CCA1* and *LHY* also negatively regulates *ELF4* expression (Kikis *et al.*, 2005). Furthermore, *ELF4* could also act together with *TOC1* to induce *LHY/CCA1*, emphasizing the complex interactions that underlie clock function (McWatters *et al.*, 2007).

*LUX* encodes a small putative Myb transcription factor necessary for activation of *CCA1* and *LHY* expression (Hazen *et al.*, 2005; Onai and Ishiura, 2005). *CCA1* and *LHY* are repressed in the *lux* mutants, whereas *TOC1* is activated. Moreover, *CCA1* and *LHY* bind to the *LUX* promoter and repress its expression (Hazen *et al.*, 2005), as they do with *TOC1*.

The clock-controlled gene *GI* encodes a nuclear protein involved in the photoperiodic control of flowering in Arabidopsis (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Huq *et al.*, 2000). *gi* mutations affect the expression of central components of the clock such as *CCA1/LHY* (Fowler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Mizoguchi *et al.*, 2002); in the same way, *GI* expression is regulated by *LHY/CCA1*, indicating that is under control of the clock and is, therefore, a clock output (Park *et al.*, 1999; Mizoguchi *et al.*, 2002). *GI* mRNA rhythms are also perturbed in *elf3* mutants, suggesting that *GI* acts downstream from *ELF3* (Fowler *et al.*, 1999). On the other hand, *GI* may have a role in *PHYB* signalling, participating in a light input pathway to the clock (Park

*et al.*, 1999; Huq *et al.*, 2000), and interacts with ZTL-like proteins (Kim *et al.*, 2007a; Sawa *et al.*, 2007). All these observations have favoured the debate about the place of *GI* in relation to the clock and recently it has been reconsidered as a clock-associated gene (Locke *et al.*, 2005b; Mizoguchi *et al.*, 2005). Besides the complex interaction with components of the oscillator, *GI* mediates between the circadian clock and the floral integrators in the photoperiodic control of flowering, an output pathway that will be discussed in the next section. In fact, *GI* regulates *CO* expression, which is down-regulated in *gi* mutants, whereas over-expression of *CO* in *gi* mutant corrects its late flowering phenotype (Suárez-López *et al.*, 2001).

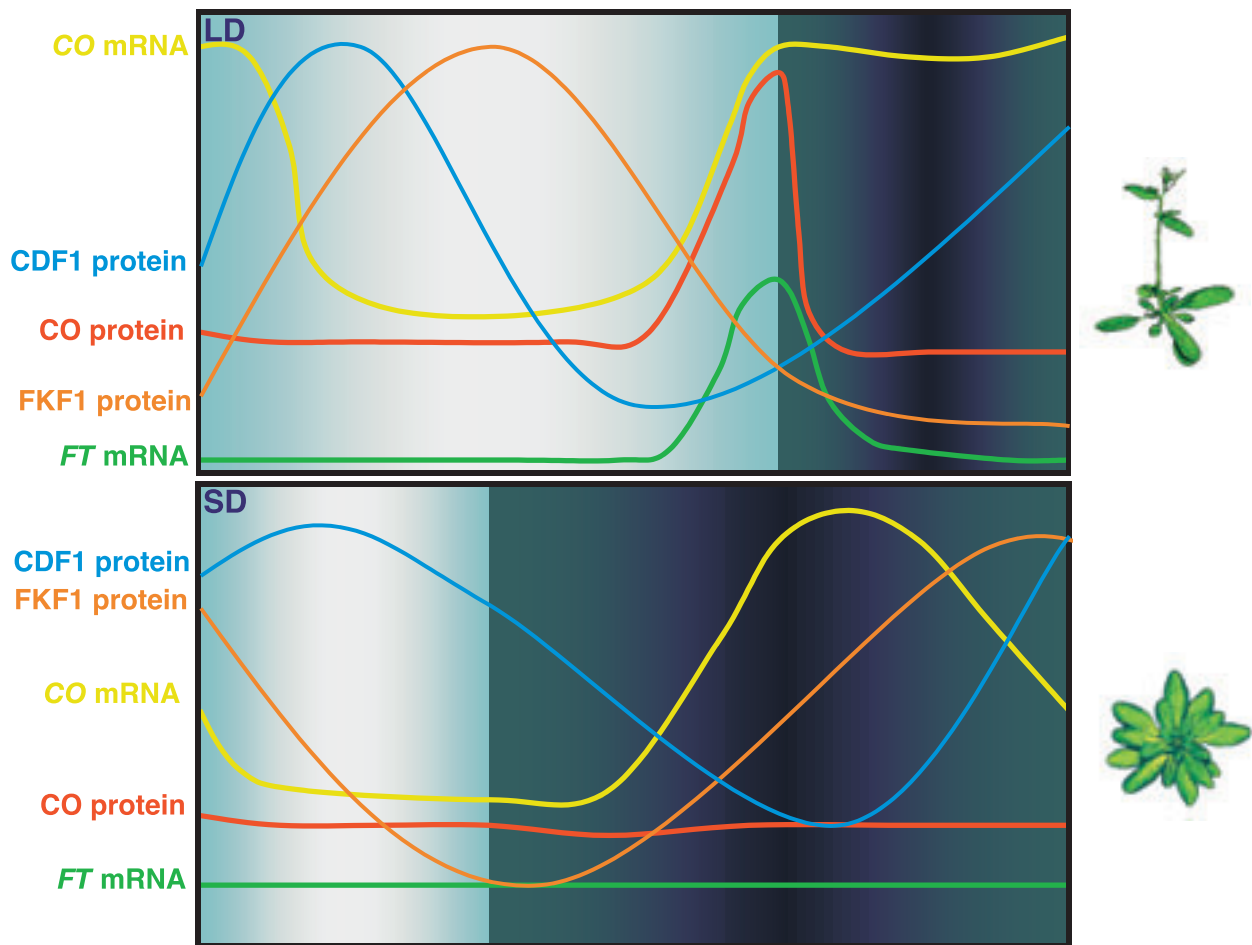
## Photoperiodic induction of flowering in Arabidopsis

The regulation of flowering time in response to daylength, one of the output pathways of the clock, has become a model of how photoperiodic mechanisms might work in Arabidopsis (Fig. 1). *CO* is probably a transcriptional regulator that plays a crucial role in the photoperiodic induction of flowering in this species (Putterill *et al.*, 1995; Robson *et al.*, 2001; Suárez-López *et al.*, 2001). *co* mutants flower late only under LD, whereas *CO* over-expression causes early flowering both under LD and SD (Putterill *et al.*, 1995; Onouchi *et al.*, 2000). *CO* by itself does not bind DNA but it is likely to participate in a CCAAT-box-binding complex involving HAP proteins (Ben-Naim *et al.*, 2006; Wenkel *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2007).

In response to LD exposure, *CO* is responsible for the activation of the so-called floral integrator genes, such as *FT* and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* that act as strong activators of flowering initiation (Putterill *et al.*, 2004; Baurle and Dean, 2006). *CO* expression is controlled by the circadian clock and suffers different daily oscillations depending on daylength conditions: in Arabidopsis plants grown under non-inductive SD conditions, the period of *CO* expression is largely confined to darkness; however, under LD photoperiods, that promote flowering, *CO* mRNA peaks during the evening before the lights are off and stay high until dawn, overlapping with the illuminated part of the day (Fig. 2). Therefore, *CO* has been postulated to function as a mediator between the circadian clock and the floral integrators *FT* and *SOC1* (Suárez-López *et al.*, 2001).

Growing evidence supports the view that the precise time of *CO* expression is crucial for daylength discrimination. Altering the peak of *CO* expression relative to subjective dusk by shortening or lengthening the duration of the day cycle from 24 to 21 or 30 h showed that the expression of *CO* during the light period correlated with *FT* up-regulation and early flowering (Roden *et al.*, 2002; Yanovsky and Kay, 2002). Similarly, in mutants like *toc1* where the clock runs faster, the peak of *CO* expression occurs earlier under SD and overlaps the light period; this change in the pattern of *CO* expression correlates with increased *FT* expression and early flowering. In contrast, in *toc1* mutants grown under SD conditions but reducing the duration of the day to 21 h, the peak of *CO* expression is restricted again to the dark period and these plants flower as late as wild-type plants (Yanovsky and Kay, 2002). Altogether, these observations indicate that light-dependent activation of *CO* protein is central in daylength measurement and photoperiodic induction of flowering.

The quality of light influences flowering in a specific way; while blue and far-red lights promote flowering in Arabidopsis through the action of PHYA, CRY1 and CRY2 photoreceptors, red light-activated PHYB delays flowering (Johnson *et al.*, 1994; Guo *et al.*, 1998; Yanovsky and Kay, 2002; Valverde *et al.*, 2004). Consistent with this, blue or far-red lights stabilize *CO* whereas in red light or darkness, *CO* is degraded with the involvement of the ubiquitin-proteasome pathway (Valverde *et al.*, 2004). These data provide support for the model of external coincidence to explain photoperiodic control of flowering (Bünning, 1936). Many factors are likely to participate in the regulation of *CO* protein stability, and some aspects of this regulation are still unclear. It remains unknown why *CO* protein abundance peaks in the late afternoon or evening on LDs, but not in the early morning when *CO* mRNA level is also high. A possibility is that the abundance or activity of proteins that participate in *CO* degradation may be controlled by the circadian clock such that they fluctuate throughout the light phase of a LD (Valverde *et al.*, 2004). Proteins such as COP1, SPA proteins and ZTL family proteins, involved in light responses or photoperiodic flowering, may regulate *CO* stability. COP1 is responsible for the proteasome-mediated degradation of HY5, LAF1, PIF3, HFR1 or PHYA (Seijo *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2003, 2004; Bauer *et al.*, 2004; Duek and Fankhauser, 2005). The four-member SPA protein family of Arabidopsis, which acts in concert with COP1 to suppress photomorphogenesis in dark-



**Figure 2.** The expression of CONSTANS provides the molecular basis for day length perception in Arabidopsis. The expression patterns of *CO* and *FT* mRNAs and CO, CDF1 and FKF1 proteins under LD (long day) and SD (short day) are shown in the cartoon. Under LD, high levels of the CDF1 protein at the beginning of the day prevent *CO* expression; FKF1 destabilizes CDF1 protein in the presence of light (left side of the panels), allowing an increase in the levels of *CO* mRNA during the evening. In this way, under long photoperiods *CO* mRNA coincides with light during a significant part of the daily cycle; since CO protein is stable in light, CO can activate *FT* expression under LD and promote flowering (upper panel). In contrast, under SD conditions *CO* mRNA is only abundant during the period of dark (right side of the panel), the CO protein does not accumulate and therefore *FT* is not expressed, resulting in delayed flowering (lower panels).

grown seedlings, is essential for photoperiodic flowering (Laubinger *et al.*, 2006). Interestingly, SPA proteins interact physically with CO *in vitro* and *in vivo*, suggesting that SPA proteins regulate CO protein function. *spa1 spa3 spa4* triple mutants are insensitive to photoperiod and exhibit strongly increased CO protein levels, which are not caused by a change in *CO* gene expression. Taken together, these results suggest that SPA proteins regulate photoperiodic flowering by controlling the stability of the floral inducer CO (Laubinger *et al.*, 2006). On the other hand, ZTL family of proteins are also capable of interacting with CO/COL family proteins (Fukamatsu *et al.*, 2005), suggesting their

possible participation in the proteasome degradation of the CO protein.

Besides the stability of CO protein, light also modulates *CO* expression at the transcriptional level; mutants affected in the blue light photoreceptor FKF1 flower late under inductive LD and lack the peak of *CO* expression that occurs late in the afternoon in LD grown plants, suggesting that FKF1 is required for this peak that facilitates the coincidence between *CO* expression and light (Fig. 2) (Imaizumi *et al.*, 2003). *FKF1* and *GI* genes are expressed similarly and regulate *CO* transcription (Fowler *et al.*, 1999; Suárez-López *et al.*, 2001; Imaizumi *et al.*, 2003); besides, it has been recently

proposed that FKF1 and GI proteins form a complex in a blue-light dependent manner that is required for day-length measurement (Sawa *et al.*, 2007). Although FKF1 does not regulate the stability of the GI protein, the timing of this interaction appears to be crucial to regulate daytime *CO* expression. In fact, FKF1 function is dependent on GI and mediates the degradation of CDF1, a *CO* repressor (Imaizumi *et al.*, 2005), facilitating the peak of *CO* expression before dusk. Moreover, GI, FKF1, and CDF1 proteins associate with *CO* chromatin and the FKF1-GI complex is recruited to the *CO* promoter in the late afternoon to regulate *CO* expression, providing a mechanistic view of how the coincidence of light with circadian timing regulates photoperiodic flowering (Niwa *et al.*, 2007; Sawa *et al.*, 2007). RED AND FAR-RED INSENSITIVE 2 (RFI2), a RING-domain zinc finger protein, is another relevant factor for shaping the *CO* mRNA profiles, although its precise role has not been defined (Chen and Ni, 2006). On the same way, PRR9, PRR7 and PRR5 have also been implicated in the activation of *CO* expression during the daytime predominantly by inactivating *CDF1* repressor (Nakamichi *et al.*, 2007). Therefore, circadian clock and light-signaling pathways are integrated at the level of *CO*, ensuring that only under LD does the activation of *CO* allow the accumulation of *FT* to levels that are sufficient to promote flowering. Together with the post-transcriptional regulation of *CO* protein (Valverde *et al.*, 2004) that we discussed earlier, this regulation represents an essential adaptive mechanism that allows plants to select the most favourable season for successful flowering.

Although *FT* is an important target, it might not be the only gene directly regulated by *CO* in the photoperiodic flowering pathway. *CO* also activates the transcription of a close homolog of *FT*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, in a similar way to *FT* regulation (Michaels *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2005). *TSF* daily expression pattern is quite similar to *FT*, although the tissue-specific patterns of expression are different; *FT* is expressed in the leaf phloem whereas *TSF* is expressed in the stem phloem, suggesting that both proteins play a similar role in the promotion of flowering.

## Spatial control of photoperiodic flowering

Several decades ago, a number of grafting experiments based on the exposure of different organs of the plant

to specific photoperiodic conditions demonstrated that daylength is perceived in the leaves (Knott, 1934). As a result, it was postulated the existence of a floral stimulus of unknown nature, that had to be produced in the leaves of photoperiodic species upon exposure to the right daylength regime; this substance(s) had to be transported through the phloem to the SAM, where the floral developmental program was triggered (Zeevart, 2006; Corbesier and Coupland, 2007). Elucidating the site where *CO* is required to promote floral initiation is a key aspect to understanding the photoperiodic regulation of flowering. Recent data indicate that *CO* acts in the vascular tissue and not in the SAM to activate *FT* and promote flowering (An *et al.*, 2004; Ayre and Turgeon, 2004); the expression of a *GUS* reporter gene in *CO::GUS* plants is strongly detected in the phloem of leaves and stems (Takada and Goto, 2003; An *et al.*, 2004). Consistent with this, *FT* is expressed in the vascular tissue (Takada and Goto, 2003). Moreover, the expression of *CO* controlled by promoters of genes expressed in the companion cells of the phloem complements the flowering time phenotype of the *co* mutant (Ayre and Turgeon, 2004), something that does not take place when *CO* is expressed from meristem specific promoters (An *et al.*, 2004), suggesting that *CO* is required in the vascular tissue to promote the floral initiation in response to LD.

*FT* is expressed in the leaves in response to photoperiod, but the *FT* protein acts in the SAM to promote gene expression, suggesting that a product of *FT* may be transported to the meristem as part of the florigen. Several reports have provided growing evidence that the mobile signal is the *FT* protein itself rather than mRNA in different species such as Arabidopsis, tomato, rice and cucurbits (Huang *et al.*, 2005; Lifschitz *et al.*, 2006; Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Lin *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2007; Tamaki *et al.*, 2007). The floral stimulus, but not detectable mRNA of genes similar to *FT*, crossed the junction between grafted tomato plants (Lifschitz *et al.*, 2006). In the case of Arabidopsis, *FT* mRNA is required only transiently in the leaf (Corbesier *et al.*, 2007). In addition, *FT* fusion proteins expressed specifically in phloem cells move to the apex and move long distances between grafted plants, concluding that *FT* protein acts as a long-distance signal that induces Arabidopsis flowering (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Mathieu *et al.*, 2007). *FT* is required for the activation in the meristem of *SOC1* (Searle *et al.*, 2006). In the apex, *FT* interacts with a transcription factor, *FD*, to induce



the expression of floral meristem identity gene *APETALA1* (*API*), that play a pivotal role in specifying floral meristems during floral transitions (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007) (Fig. 1). It is likely that other molecules such as microRNAs (miRNAs) have supporting roles to the florigen, as some of them have been detected in phloem sap as well (Yoo *et al.*, 2004).

Consistent with the role of *FT* as an integrator of flowering signals, this locus is a direct target of *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) and *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), repressors that mediate flowering responses to winter temperatures or to moderate changes in ambient temperature, respectively (Searle *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). In addition, chromatin modifications in the genomic regions of *FT* prevent inappropriate expression of this gene that acts as a floral switch (Piñeiro *et al.*, 2003; Takada and Goto, 2003; Germann *et al.*, 2006; Imaizumi and Kay, 2006; Turck *et al.*, 2007).

## Conservation of the photoperiodic flowering response in rice

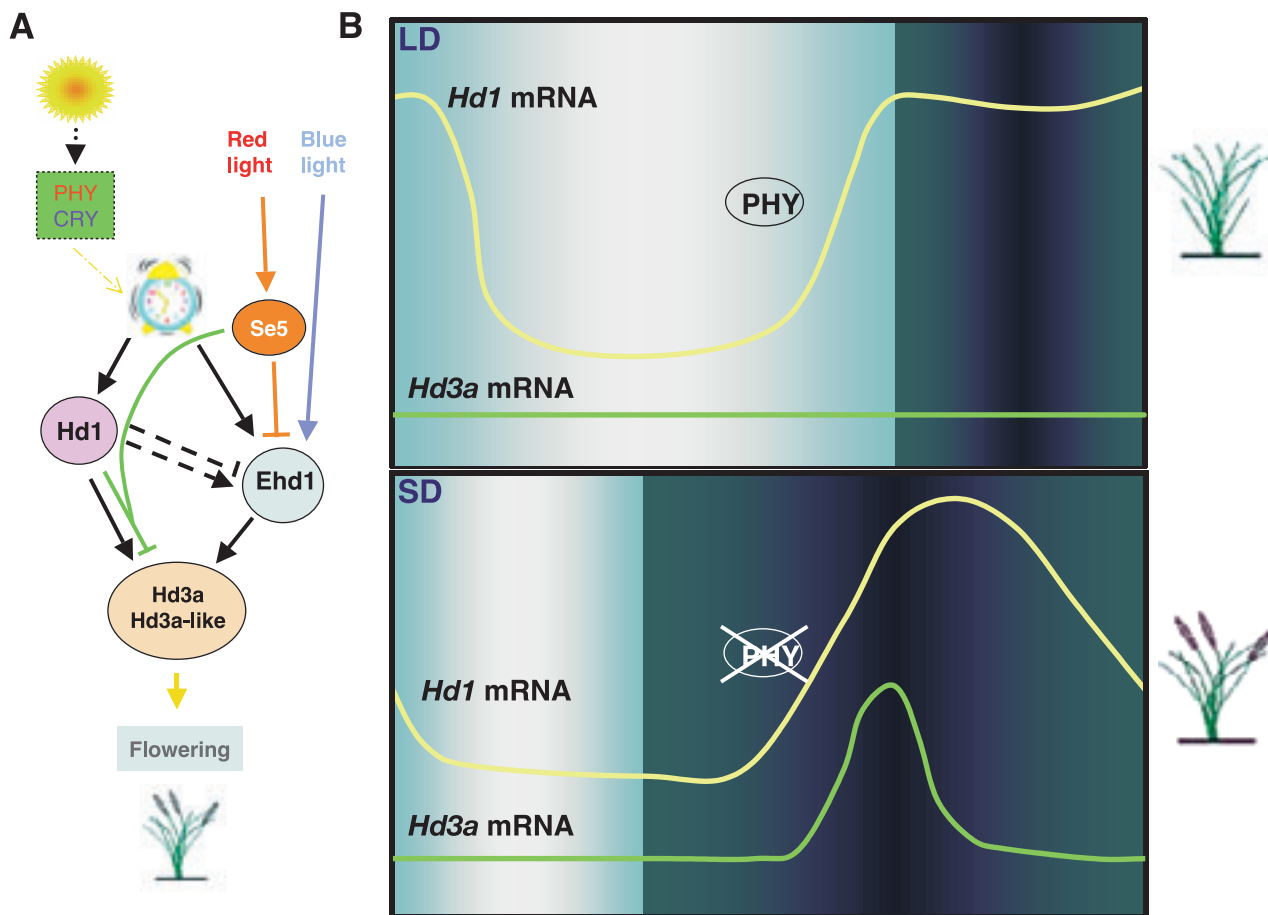
Photoperiodic control of flowering initiation is widespread among plant species, although it remains unknown whether the components involved in the photoperiodic induction of flowering in Arabidopsis are conserved, especially in those plant species displaying different photoperiodic responses, such as SD and DN plants. Genomic and genetic comparison of components involved in the photoperiodic control of flowering in Arabidopsis and rice, a SD plant, argues for the conservation of regulatory networks in both species (Izawa *et al.*, 2003; Izawa, 2007a). Indeed, the cloning of the rice quantitative trait loci (QTL) *Heading-date1* (*Hd1*), *Hd3a* and *Hd6*, responsible for natural variation in flowering time or heading date, supports this view. *Hd1* encodes a protein with high similarity to CO (Yano *et al.*, 2000); *Hd3a* is highly similar to Arabidopsis *FT* (Kojima *et al.*, 2002); and *Hd6* encodes the  $\alpha$ -subunit of the CK2 protein (Takahashi *et al.*, 2001), which has a crucial role in the regulation of clock function in different organisms.

*CCA1/LHY*- and *TOC1*-like genes, other members of the family of pseudo-response regulators of Arabidopsis, as well as *GI*, *ZTL*, *LKP2*, *FKF1*, *CDF1*, *ELF3*, *ELF4*, *LUX*, etc., are also found in the rice genome (Doyle *et al.*, 2002; Izawa *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2003, 2007a,b; Staiger *et al.*, 2003; Hayama and

Coupland, 2004; Izawa, 2007a; Nakamura, 2007). A gene related to *CCA1/LHY* exhibits circadian rhythms with a phase similar to that of Arabidopsis *CCA1* (Izawa *et al.*, 2002, 2003). A quintet of PRR-like proteins reminiscent to that described in Arabidopsis is also found in rice (*OsPRR73*, *OsPRR37*, *OsPRR95*, *OsPRR59* and *OsPRR1*) (Murakami *et al.*, 2005, 2007b). *OsPRR37* maps close to the *Hd2*-QTL (Yano *et al.*, 2001), identified as the major component enhancing the photoperiod sensitivity of flowering in Nipponbare variety; indeed, the Kasalath *OsPRR37* allele bears a severe mutation in the coding region (Murakami *et al.*, 2005). This locus is highly related to the barley pseudo response regulator *Ppd-H*, a locus involved in adaptation to photoperiod in this species (Turner *et al.*, 2005).

PHYs are likely to play an essential role in the regulation of photoperiodic flowering responses in rice, as suggested by the severe early flowering and insensitivity to daylength displayed by the *photoperiod sensitivity 5* (*se5*) mutant; *Se5* is similar to the heme oxygenase involved in the biosynthesis of the PHY chromophore in Arabidopsis (Fig. 3A) (Izawa *et al.*, 2000). Circadian rhythms are largely unaffected in *se5* mutants and the expression of clock output genes is not altered, indicating that rice PHYs must participate in a pathway regulating photoperiodic flowering at least in part independently of the clock (Fig. 3A); this pathway is required to repress the expression of rice *FT* homologue genes (Izawa *et al.*, 2002), and may act similarly to the Arabidopsis PHYB-mediated pathway required to repress flowering independently of the clock, where phyB signals to PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (*PFT1*) to regulate *FT* expression in response to suboptimal light conditions (Cerdan and Chory, 2003). Arabidopsis *PFT1*, with a putative orthologue in rice (*gi* 115478458), has been recently proposed as the Med25 subunit of the plant Mediator complex that mediates communication between transcription regulatory proteins and core promoters, establishing interactions with the C-terminal domain of the largest Pol II subunit (Bäckström *et al.*, 2007).

The transcriptional analysis of *se5* mutants led to the confirmation that a *GI* ortholog is present in rice. *OsGI* is expressed at lower levels in *se5*, is circadian-clock regulated and it follows a temporal pattern of expression similar to that of *AtGI* (Hayama *et al.*, 2002). *OsGI* overexpression causes a delay in flowering of rice plants, and increased expression of *Hd1*; in contrast, *Hd3a* expression was significantly reduced, suggesting that *OsGI* acts to promote *Hd1* expression



**Figure 3.** Molecular basis for photoperiodic flowering in rice. A) Genetic components involved in the regulation of photoperiodic flowering in rice. The circadian clock regulates *Hd1* (*CO* orthologue) expression, while both light and the clock control the expression of *Ehd1*. *Hd1* and *Ehd1* are likely to interact (dashed line) to finely tune the time of heading in rice, although the mechanisms involved remain poorly understood. Under SD, both *Hd1* and *Ehd1* promote flowering by activating *Hd3* (*FT* orthologue) expression; in contrast, in LD conditions *Hd1* delays flowering (green line), and this repression is PHY-dependent. B) Schematic representation of *Hd1* and *Hd3a* mRNAs during a 24 hour cycle under LDs (upper panel) and SDs (lower panel). Under LDs, *Hd1* protein is exposed to day light and, in a process mediated by PHYs, acts to repress *Hd3a* expression, delaying heading of rice plants. In contrast, in SDs, in the absence of active PHYs, *Hd1* protein acts to activate *Hd3a* expression and promote heading.

in LD, perhaps through a mechanism similar to that operating in *Arabidopsis*, but *Hd1* activity results in repression of *Hd3a* expression under LD conditions (Hayama *et al.*, 2003). These observations are consistent with the phenotype of *hd1* mutants that flower earlier than wild-type and have higher levels of *Hd3a* mRNA under LD (Izawa *et al.*, 2002; see below).

Recent data with transgenic plants have shed some light on how the same genes lead to opposite flowering responses in *Arabidopsis* and rice (Fig. 3A,B). As in *Arabidopsis*, overexpression of *Hd3a*, the likely *FT* orthologue in rice, accelerates flowering (Kojima *et al.*, 2002). However, in contrast to *Arabidopsis*, *Hd3a*

expression in wild type plants is induced under SD (Kojima *et al.*, 2002), and this daylength-dependent regulation of *Hd3a* is mediated by *Hd1*, which exhibits diurnal patterns of expression similar to those of *Arabidopsis CO* under LDs and SDs (Izawa *et al.*, 2002; Kojima *et al.*, 2002; Hayama *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2004). *Hd1* promotes heading under SD but represses it under LD, because loss of *Hd1* function causes early flowering and increased transcription of *Hd3a* under LDs, but late flowering and decreased *Hd3a* mRNA levels under SD (Yano *et al.*, 2000; Izawa *et al.*, 2002; Kojima *et al.*, 2002). In rice, coincidence of *Hd1* expression and exposure to light may generate

LD signals that inhibit *Hd3a* transcription and prevent flowering; the floral repression activity of Hd1 under LDs depends on *Se5*, and *se5 hd1* plants never flower earlier than each single mutant under LDs, suggesting that both genes inhibit flowering within the same genetic pathway. In fact, *se5 hd1* double mutants flower later than *se5* mutant, indicating that, in the absence of *Se5*, *Hd1* can promote flowering under LDs (Izawa *et al.*, 2002). Therefore, Hd1 represses flowering under LDs, conditions in which this protein is expressed in the evening, overlapping with the period of light. The coincidence of Hd1 with the illuminated part of the day leads to *Hd3a* repression, and this process probably requires the participation of active phytochrome. In contrast, under SDs, Hd1 is only expressed during the period of darkness, when active phytochrome is absent. In these conditions, Hd1 protein is capable to induce *Hd3a* expression and consequently promote heading (Fig. 3B). Other factors must be involved in this regulatory mechanism so that activation of *Hd3a* under LDs can be achieved in *hd1* mutant background. Intriguingly, the repressive function of Hd1 requires the involvement of PHYB; loss of PHYB activity leads to early flowering in rice (Ishikawa *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2005), similar to the effects of *phyB* mutations in Arabidopsis (Reed *et al.*, 1993), albeit for a different reason: while PHYB antagonizes the activation of *FT* by CO in Arabidopsis (Cerdán and Chory, 2003; Halliday *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2005), it stimulates the repression of *Hd3a* by Hd1 in rice (Ishikawa *et al.*, 2005). Conservation of the floral pathways CO/*FT* and Hd1/*Hd3a* strongly suggests that *Hd3a* is also involved in transmissible signals in rice and molecular confirmation of this role has been obtained recently (Tamaki *et al.*, 2007).

The molecular basis for the dual role of Hd1 protein in both activation (SD) and repression (LD) of flowering remains obscure. The *CO* orthologue from the SD plant *Pharbitis nil* can complement the flowering time defects of the Arabidopsis *co* mutant (Liu *et al.*, 2001b); in the same way, the *Hd1* orthologue from wheat, a LD plant, can complement defects in the rice *Hd1* gene (Nemoto *et al.*, 2003), suggesting that protein structural differences among CO orthologues are unlikely to explain distinct photoperiodic flowering responses across species. In fact, recent results support the notion that different regulatory mechanisms might underlie the photoperiodic flowering responses found in plant species. For instance, SD response in *Pharbitis* is controlled by a dedicated light sensitive clock, set by dusk, that activates two

putative orthologs of *FT* (*PnFT1* and *PnFT2*) transcription in darkness, a different mechanism for measuring daylength than those described for Arabidopsis and rice (Hayama *et al.*, 2007).

In addition, despite the conservation of key components of the photoperiod-promoting pathways in rice, Arabidopsis and other species, specific factors might still exist in some of these species but not in others. A two-component signaling cascade is integrated into the conserved pathway in the photoperiodic control of flowering in rice (Doi *et al.*, 2004). Early heading date 1 (*Ehd1*) is a transcription factor that confers SD promotion of flowering regulating *FT-like* and MADS box gene expression in the absence of a functional allele of *Hd1*. *Ehd1*, without orthologues in Arabidopsis, is expressed only in the presence of blue light signals with an *Hd1*-deficient background (Izawa, 2007a). *Ehd1* could participate in developmental or environmental signals mediated not only by light but also by phytohormones, which may affect flowering time in some plant species (Samach *et al.*, 2000). At least two factors that regulate *Ehd1* expression have been isolated; one of them, *Oryza sativa* LEC2 and FUSCA LIKE 1 (OsLFL1) is a B3 transcription factor that causes late flowering when overexpressed. In these overexpression lines OsLFL1 appears to repress *Ehd1* by binding its promoter (Peng *et al.*, 2007, 2008). In contrast, OsMADS51 acts to promote flowering initiation under SD; *OsMADS51* functions downstream of *OsGI* and upstream of *Ehd1*, activating its expression (Kim *et al.*, 2007b). However, few genes have been found to act downstream of *Ehd1*, suggesting that this gene acts as a floral inducer in the final steps of the photoperiodic pathway in rice. Interestingly during domestication, the adaptation of rice to northern regions by artificial selection may have become possible through the interactions of the *Hd1*- and *Ehd1*-dependent pathways (Izawa, 2007b).

## Day-neutral response of photoperiodic flowering in tomato

Current tomato cultivars with DN responses have been bred using genetic selection. The modern tomato has a mild SD response that is sometimes unnoticed due to other environmental conditions (high light or mild temperatures). The molecular mechanisms underlying the photoperiodic responses of DN plants are poorly characterized and we do not know yet whether the

ancestral tomato had a strong photoperiodic response and became DN or these plants already had a DN response type. Gene expression patterns reveal that tomato has a circadian clock mechanism (Ben-Naim *et al.*, 2006; Facella *et al.*, 2006), and several processes have been reported to be controlled by the circadian clock (Samach and Lotan, 2007). Since photoperiod has little effect on flowering of tomato, mutations in the clock apparatus may not influence tomato flowering; however, recent evidence suggests that tomatoes have a sense of time measurements and that the connection between the circadian clock and one of the output pathways, the flowering response, may be impaired at a certain point (Mizoguchi *et al.*, 2007). Tomatoes possess *GI*, *LHY*, *CO* and *FT* homologs (Ben-Naim *et al.*, 2006; Lifschitz *et al.*, 2006; Niinuma *et al.*, 2007). The *GI* and *LHY* homologs show diurnal and circadian expression patterns, and may have similar functions to those of Arabidopsis. This suggests that these genes may also be involved in the regulation of the circadian time in tomato (Niinuma *et al.*, 2007). Unexpectedly, overexpressing the Arabidopsis *CO* gene or tomato *CO*-like genes in tomato did not seem to affect flowering time, even when the overexpression of a tomato *CO* gene does have a strong effect in Arabidopsis flowering (Ben-Naim *et al.*, 2006). This might suggest that *CO*-like genes are not linked to flowering in tomato, although this possibility should be tested first by analyzing loss-of-function alleles of tomato *CO* homologs.

Mutations in an *FT* homolog in tomato (*SINGLE FLOWER TRUSS*; *SFT*) delays flowering, which indicates that *SFT* in tomato actually functions as a floral activator in a similar way to those Arabidopsis and rice homologs (Lifschitz and Eshed, 2006; Lifschitz *et al.*, 2006). *SFT*-dependent graft-transmissible signals complement all developmental defects in *sft* plants. Since no *SFT* mRNA could be detected in the recipient, either *SFT* protein is the mobile signal or *SFT* may elicit a secondary mobile signal (Lifschitz *et al.*, 2006). Whether the *GI*, *LHY* and *CO* tomato homologs are affecting the expression of *FT* or how is the expression of the *FT* gene regulated are still open questions.

The analysis of several thousands expressed sequence tags (ESTs) revealed that 30% of the genes identified appear to be unique to tomato (Yamamoto *et al.*, 2005). Then, novel players may have pivotal roles in the control of flowering time in tomato. Moreover, the isolation of tomato mutants with delayed or accelerated flowering phenotypes and the identification of genes responsible for these phenotypes will be crucial steps

for the comparison of mechanisms underlying the three classes of the photoperiodic flowering responses in plants.

## Future perspective

In recent years, we have gained a better understanding of the molecular mechanisms by which plants sense photoperiodic changes within the leaf and integrate the information to set their developmental fate in the shoot apex. While central aspects of how photoperiod is perceived and how the signal is released from the leaves to the SAM are known, we do not completely understand the photoperiodic flowering process. Despite the significant progress achieved, a number of key questions remain unanswered. New components involved in the regulation of *CO* and *FT* expression and activity need to be identified and the functional interactions between known factors, as well as newly identified, must be explored. Given that the spatio-temporal regulation of the *CO* and *FT* expression patterns is crucial to this pathway, it will be essential to determine the expression pattern of the genes involved to contemplate the molecular mechanisms underlying their regulation. The manipulation of the spatial distribution of gene activity by tissue-specific overexpression or through more specific approaches such as the ablation of gene function in specific tissues or cells, already employed with *FT* and *TSF*, would be useful to study if clock components working upstream of *CO*, and *CO* itself, are required in phloem companion cells. The use of Arabidopsis, rice and tomato as model species will allow the identification of new factors involved in the regulation of flowering and other photoperiod-mediated processes as well as increase our knowledge of how these factors interact to enable the perception and response to daylength. Finally, one question remains and will be the focus in the coming years; this is, understanding the nature, regulation and the mode of action of the signals generated in the sites of daylength perception as well as establishing how developmental programs are triggered in the sites where the evoked responses occur. In fact, the conserved *CO/FT* module is being used in other photoperiod-dependent processes, such as tuberization in potatoes and bud dormancy in trees (Martínez-García *et al.*, 2002; Böhlenius *et al.*, 2006). The identification of downstream elements of such module that provide specificity in these developmental processes should in turn also inform our understanding of floral induction.



## Acknowledgments

Funding for the authors is supported by grants BIO2005-00251 to J.A.J. and BIO2004-00494 to M.P. from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología.

## References

- ABE M., KOBAYASHI Y., YAMAMOTO S., DAIMON Y., YAMAGUCHI A., IKEDA Y., ICHINOKI H., NOTAGUCHI M., GOTO K., ARAKIT., 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator *FT* at the shoot apex. *Science* 309, 1052-1056.
- AHMAD M., JARILLO J.A., SMIRNOVA O., CASHMORE A.R., 1998. The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol Cell* 1, 939-948.
- ALABADÍ D., OYAMA T., YANOVSKY M.J., HARMON F.G., MÁS P., KAY S.A., 2001. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 293, 880-883.
- ALABADÍ D., YANOVSKY M.J., MÁS P., HARMER S.L., KAY S.A., 2002. Critical role for *CCA1* and *LHY* in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 12, 757-761.
- ALLEN T., KOUSTENIS A., THEODOROU G., SOMERS D.E., KAY S.A., WHITELAM G.C., DEVLIN P.F., 2006. *Arabidopsis* FHY3 specifically gates phytochrome signaling to the circadian clock. *Plant Cell* 18, 2506-2516.
- AN H., ROUSSOT C., SUÁREZ-LÓPEZ P., CORBESIER L., VINCENT C., PIÑEIRO M., HEPWORTH S., MOURADOV A., JUSTIN S., TURNBULL C., COUPLAND G., 2004. CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* 131, 3615-3626.
- AYRE B., TURGEON R., 2004. Graft transmission of a floral stimulant derived from CONSTANS. *Plant Physiol* 135, 1-8
- BÄCKSTRÖM S., ELFVING N., NILSSON R., WINGSLE G., BJÖRKLUND S., 2007. Purification of a plant mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit. *Mol Cell* 26, 717-729.
- BAUER D., VICZIAN A., KIRCHER S., NOBIS T., NITSCHKE R., KUNKEL T., PANIGRAHI K.C., ADAM E., FEJES E., SCHAFFER E., NAGY F., 2004. Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 1433-1445.
- BAURLE I., DEAN C., 2006. The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125, 655-664.
- BEN-NAIM O., ESHED R., PARNIS A., TEPPER-BAMNOLKER P., SHALIT A., COUPLAND G., SAMACH A., LIFSCHITZ E., 2006. The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J* 46, 462-476.
- BÖHLENIUS H., HUANG T., CHARBONNEL-CAMPAA L., BRUNNER A.M., JANSSON S., STRAUSS S.H., NILSSON O., 2006. CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312, 1040-1043.
- BÜNNING E., 1936. Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber Dtsch Bot Ges* 54, 590-607. [In German].
- BÜNNING E., 1960. Circadian rhythms and the time measurement in photoperiodism. *Cold Spr Harb Symp Quant Biol* 25, 249-256.
- CAI X., BALLIF J., ENDO S., DAVIS E., LIANG M., CHEN D., DEWALD D., KREPS J., ZHU T., WU Y., 2007. A putative CCAAT-binding transcription factor is a regulator of flowering timing in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 145, 98-105.
- CASHMORE A.R., 2003. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* 114, 537-543.
- CERDAN P., CHORY J., 2003. Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423, 881-885.
- CHAILAKHYAN M.K., 1936a. [About the mechanism of the photoperiodic response.]. *Dokl Akad Nauk SSSR (CR Acad Sci USSR)* 1, 85-89. [In Russian].
- CHAILAKHYAN M.K., 1936b. [New facts supporting the hormonal theory of plant development.]. *Dokl Akad NaukSSSR (CR Acad Sci USSR)* 4, 77-81. [In Russian].
- CHAILAKHYAN M.K., 1937. Gormonal'naya teoriya razvitiya rastenii [Hormonal theory of plant development]. *Akademiï Nauk SSSR (Academy of Sciences of the USSR)*, Moscow. [In Russian].
- CHEN M., NI M., 2006. RFI2, a RING-domain zinc finger protein, negatively regulates *CONSTANS* expression and photoperiodic flowering. *Plant J* 46, 823-833.
- CHRISTIE J.M., 2007. Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* 58, 21-45.
- CORBESIER L., COUPLAND G., 2005. Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant Cell Environ* 28, 54-66.
- CORBESIER L., COUPLAND G., 2007. The quest of florigen: a review of recent progress. *J Exp Bot* 57, 3395-3403.
- CORBESIER L., VINCENT C., JANG S., FORNARA F., FAN Q., SEARLE I., GIAKOUNTIS A., FARRONA S., GISSOT L., TURNBULL C., COUPLAND G., 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030-1033.
- COVINGTON M.F., PANDA S., LIU X.L., STRAYER C.A., WAGNER D.R., KAY S.A., 2001. *ELF3* modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1305-1315.
- DANIEL X., SUGANO S., TOBIN E.M., 2004. CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3292-3297.
- DEVLIN P.F., KAY S.A., 2000. Cryptochromes are required for phytochrome signalling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12, 2499-2509.

- DEVLIN P.F., KAY S.A., 2001. Circadian photoperception. *Ann Rev Physiol* 63, 677-694.
- DING Z., MILLAR A.J., DAVIS A.M., DAVIS S.J., 2007. *TIME FOR COFFEE* encodes a nuclear regulator in the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Plant Cell* 19, 1522-1536.
- DOI K., IZAWA T., FUSE T., YAMANOUCHI U., KUBO T., SHIMATANI Z., YANO M., YOSHIMURA A., 2004. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT*-like gene expression independently of Hd1. *Genes Dev* 18, 926-936.
- DOYLE M.R., DAVIS S.J., BASTOW R.M., MCWATTERS H.G., KOZMA-BOGNAR L., NAGY F., MILLAR A.J., AMASINO R.M., 2002. The *ELF4* gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 419, 74-77.
- DUEK P.D., FANKHAUSER C., 2005. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci* 10, 51-54.
- ENDO M., NAKAMURA S., ARAKI T., MOCHIZUKI N., NAGATANI A., 2005. Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppression *FLOWERING LOCUS T* expression in *Arabidopsis* vascular bundles. *Plant Cell* 17, 1941-1952.
- FACELLA P., LÓPEZ L., CHIAPPETTA A., BITONTI M.B., GIULIANO G., PERROTTA G., 2006. *CRY-DASH* gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS Lett* 580, 4618-4624.
- FARRÉ E.M., KAY S.A., 2007. PRR7 protein levels are regulated by light and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant J* 52, 548-560.
- FARRÉ E.M., HARMER S.L., HARMON F.G., YANOVSKY M.J., KAY S.A., 2005. Overlapping and distinct roles of *PRR7* and *PRR9* in the *Arabidopsis* circadian clock. *Curr Biol* 15, 47-54.
- FOWLER S., LEE K., ONOUCHI H., SAMACH A., RICHARDSON K., MORRIS B., COUPLAND G., PUTTERILL J., 1999. *GIGANTEA*: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several membrane-spanning domains. *EMBO J* 18, 4679-4688.
- FRANKLIN K.A., LARNER V.S., WHITELAM G.C., 2005. The signal transducing photoreceptors of plants. *Int J Dev Biol* 149, 653-664.
- FUJIMORI T., YAMASHINO T., KATO T., MIZUNO T., 2004. Circadian-controlled basic/helix-loop-helix factor, PIL6, implicated in light-signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45, 1078-1086.
- FUKAMATSU Y., MITSUI S., YASUHARA M., TOKIOKA Y., IHARA N., FUJITA S., KIYOSUE T., 2005. Identification of LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2)-interacting factors that can recruit LKP2 to nuclear bodies. *Plant Cell Physiol* 46, 1340-1349.
- GARDNER M.J., HUBBARD K.E., HOTTA C.T., DODD A.N., WEBB A.A.R., 2006. How plants tell the time. *Biochem J* 397, 15-24.
- GARNER W.W., ALLARD H.A., 1920. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J Agric Res* 18, 553-606.
- GERMANN S., JUUL-JENSEN T., LETARNEC B., GAUDIN V., 2006. DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling in vivo, and its use to identify putative LHP1 target loci. *Plant J* 48, 153-163.
- GILIBERTO L., PERROTTA G., PALLARA P., WELLER J.L., FRASER P.D., BRAMLEY P.M., FIORE A., TAVAZZA M., GIULIANO G., 2005. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiol* 137, 199-208.
- GOTO N., KUMAGAIT, KOORNNEEF M., 1991. Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiol Plant* 83, 209-215.
- GREEN R.M., TOBIN E.M., 1999. Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4176-4179.
- GRIFFITHS S., DUNFORD R.P., COUPLAND G., LAURIE D.A., 2003. The evolution of *CONSTANS-like* gene families in barley, rice, and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131, 1855-1867.
- GUO H., YANG H., MOCKLER T., LIN C., 1998. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279, 1360-1363.
- HALL A., KOZMA-BOGNAR L., BASTOW R.M., NAGY F., MILLAR A.J., 2002. Distinct regulation of *CAB* and *PHYB* gene expression by similar circadian clocks. *Plant J* 32, 529-537.
- HALL A., BASTOW R.M., DAVIS S.J., 2003. The *TIME FOR COFFEE* gene maintains the amplitude and timing of *Arabidopsis* circadian clocks. *Plant Cell* 15, 2719-2729.
- HALLIDAY K.J., SALTER M.G., THINGNAES E., WHITELAM G.C., 2003. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator *FT*. *Plant J* 33, 875-885.
- HAMNER K.C., 1940. Interaction of light and darkness in photoperiodic induction. *Bot Gaz* 101, 658-687.
- HAMNER K.C., BONNER J., 1938. Photoperiodism in relation to hormones as factors in floral initiation and development. *Bot Gaz* 100, 388-431.
- HAN L., MASON M., RISSEEUW E.P., CROSBY W.L., SOMERS D.E., 2004. Formation of an SCF<sup>ZTL</sup> complex is required for proper regulation of circadian timing. *Plant J* 40, 291-301.
- HARMER S.L., KAY S.A., 2005. Positive and negative factors confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1926-1940.
- HARMER S.L., HOGENSEN J.B., STRAUME M., CHANG H.S., HAN B., ZHU T., WANG X., KREPS J.A., KAY S.A., 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, 2110-2113.
- HAYAMA R., COUPLAND G., 2003. Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 6, 13-19.

- HAYAMA R., COUPLAND G., 2004. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 135, 677-684.
- HAYAMA R., IZAWA T., SHIMAMOTO K., 2002. Isolation of rice genes possibly involved in the photoperiodic control of flowering by a fluorescent differential display method. *Plant Cell Physiol* 43, 494-504.
- HAYAMA R., YOKOI S., TAMAKI S., YANO M., SHIMAMOTO K., 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature* 422, 719-722.
- HAYAMA R., AGASHE B., LULEY E., KING R., COUPLAND G., 2007. A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Pharbitis*. *Plant Cell* 19, 2988-3000.
- HAYEN S.P., SCHULTZ T.F., PRUNEDA-PAZ J.L., BOREVITZ J.O., ECKER J.R., KAY S.A., 2005. *LUX ARRHYTHMO* encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10387-10392.
- HICKS K.A., MILLAR A.J., CARRÉ I.A., SOMERS D.E., STRAUME M., MEEKS-WAGNER D.R., KAY S.A., 1996. Conditional circadian dysfunction of the *Arabidopsis* *early-flowering 3 mutant*. *Science* 274, 790-792.
- HICKS K.A., ALBERTSON T.M., WAGNER D.R., 2001. *EARLY FLOWERING 3* encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1281-1292.
- HIROSE F., SHINOMURA T., TANABATA T., SHIMADA H., TAKANO M., 2006. Involvement of rice cryptochromes in de-etiolation responses and flowering. *Plant Cell Physiol* 47, 915-925.
- HOTTA C.T., GARDNER M.J., HUBBARD K.E., BAEK S.J., DALCHAU N., SUHITA D., DODD A.N., WEBB A.A., 2007. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant Cell Environ* 30, 333-349.
- HUANG T., BOHLENIUS H., ERIKSSON S., PARCY F., NILSSON O., 2005. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309, 1694-1696.
- HUQ E., QUAIL P.H., 2002. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J* 21, 2441-2450.
- HUQ E., TEPPERMAN J.M., QUAIL P.H., 2000. GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 9789-9794.
- IMAIZUMI T., KAY S.A., 2006. Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends Plant Sci* 11, 550-558.
- IMAIZUMI T., TRAN H.G., SWARTZ T.E., BRIGGS W.R., KAY S.A., 2003. *FKF1* is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426, 302-306.
- IMAIZUMI T., SCHULTZ T.F., HARMON F.G., HO L.A., KAY S.A., 2005. *FKF1* F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Science* 309, 293-297.
- ISHIKAWA R., TAMAKI S., YOKOI S., INAGAKI N., SHINOMURA T., TAKANO M., SHIMAMOTO K., 2005. Suppression of the floral activator *Hd3a* is the principal cause of the night break effect in rice. *Plant Cell* 17, 3326-3336.
- ISHIKAWA M., KIBA T., CHUA N.H., 2006. The *Arabidopsis* *SPA1* gene is required for circadian clock function and photoperiodic flowering. *Plant J* 46, 736-746.
- ITO S., NAKAMICHI N., KIBA T., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2007. Rhythmic and light-inducible appearance of clock-associated pseudo-response regulator protein *PRR9* through programmed degradation in the dark in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 48, 1644-1651.
- IZAWA T., 2007a. Daylength measurements by rice plants in photoperiodic short-day flowering. *Int Rev Cytol* 256, 191-222.
- IZAWA T., 2007b. Adaptation of flowering-time by natural and artificial selection in *Arabidopsis* and rice. *J Exp Bot* 58, 3091-3097.
- IZAWA T., OIKAWA T., TOKUTOMI S., OKUNO K., SHIMAMOTO K., 2000. Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice a short-day plant. *Plant J* 22, 391-399.
- IZAWA T., OIKAWA T., SUGIYAMA N., TANISAKA T., YANO M., SHIMAMOTO K., 2002. Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice. *Genes Dev* 16, 2006-2020.
- IZAWA T., TAKAHASHI Y., YANO M., 2003. Comparative biology comes into bloom: genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 6, 113-120.
- JAEGER K.E., WIGGE P.A., 2007. *FT* protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 17, 1050-1054.
- JARILLO J.A., PIÑEIRO M., 2006. The molecular basis of photoperiodism. *Biol Rhythms Res* 37, 353-380.
- JARILLO J.A., CAPEL J., TANG R.H., YANG H.Q., ALONSO J.M., ECKER J.R., CASHMORE A.R., 2001. An *Arabidopsis* circadian clock component interacts with both *CRY1* and *PHYB*. *Nature* 410, 487-490.
- JIAO Y., LAU O.S., DENG X.W., 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Natl Rev Genet* 8, 217-230.
- JOHNSON E., BRADLEY M., HARBERD N.P., WHITELAM G.C., 1994. Photoresponses of light grown *phyA* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 105, 141-149.
- KEVEI E., GYULA P., HALL A., 2006. Forward genetic analysis of the circadian clock separates the multiple functions of *ZEITLUPE*. *Plant Physiol* 140, 933-945.
- KIBA T., HENRIQUES R., SAKAKIBARA H., CHUA N.H., 2007. Targeted degradation of *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5* by an *SCF<sup>ZTL</sup>* complex regulates clock function and photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 2516-2530.
- KIKIS E.A., KHANNA R., QUAIL P.H., 2005. *ELF4* is a phytochrome-regulated component of a negative feedback loop involving the central oscillator components *CCA1* and *LHY*. *Plant J* 44, 300-313.
- KIM J., YI H., CHOI G., SHIN B., SONG P.S., CHOI G., 2003a. Functional characterization of Phytochrome Inter-



- acting Factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction. *Plant Cell* 15, 2399-2407.
- KIM J.Y., SONG H.R., TAYLOR B.L., CARRÉ I.A., 2003b. Light-regulated translation mediates gated induction of the Arabidopsis clock protein LHY. *EMBO J* 22, 935-944.
- KIM W.Y., GENG R., SOMERS D.E., 2003c. Circadian phase-specific degradation of the F-box protein ZTL is mediated by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4933-4938.
- KIM W.Y., FUJIWARA S., SUH S.S., KIM J., KIM Y., HAN L., DAVID K., PUTTERILL J., NAM H.G., SOMERS D.E., 2007a. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449, 356-360.
- KIM S.L., LEE S., KIM H.J., NAM H.G., AN G., 2007b. *OSMADS51* is a short day flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *OSMADS14* and *HD3a*. *Plant Physiol* 145, 1484-1494.
- KLEBS G., 1913. Über das Verhältnis der Aussenwelt zur Entwicklung der Pflanze. *Sber Akad Wiss Heidelberg* 5, 1-47. [In German].
- KNOTT J.E., 1934. Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proc Soc Hortic Sci* 31, 152-154.
- KOBAYASHI Y., WEIGEL D., 2007. Move on up, it's time for change mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev* 21, 2371-2384.
- KOJIMA S., TAKAHASHI Y., KOBAYASHI Y., MONNA L., SASAKI T., ARAKI T., YANO M., 2002. *Hd3a*, a rice ortholog of the Arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol* 43, 1096-1105.
- LAUBINGER S., MARCHAL V., GENTILHOMME J., WENKEL S., ADRIAN J., JANG S., KULAJTA C., BRAUN H., COUPLAND G., HOECKER U., 2006. Arabidopsis SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133, 3213-3222.
- LEE J.H., YOO S.J., PARK S.H., HWANG I., LEE J.S., AHN J.H., 2007. Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes Dev* 21, 397-402.
- LIFSCHITZ E., ESHED Y., 2006. Universal florigenic signals triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *J Exp Bot* 57, 3405-3414.
- LIFSCHITZ E., EVIATAR T., ROZMAN A., SHALIT A., GOLDSHMIDT A., AMSELLEM Z., ÁLVAREZ J.P., ESHED Y., 2006. The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 6398-6403.
- LIN C., SHALITIN D., 2003. Cryptochrome structure and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol* 54, 469-496.
- LIN M.K., BELANGER H., LEE Y.J., VARKONYI-GASIC E., TAOKA K.I., MIURA E., XOCONOSTLE-CÁZARES B., GENDLER K., JORGENSEN R.A., PHINNEY B., 2007. FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* 19, 1488-1506.
- LIU X.L., COVINGTON M.F., FANKHAUSER C., CHORY J., WAGNER D.R., 2001a. *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an Arabidopsis PHYB signal transduction pathway. *Plant Cell* 13, 1293-1304.
- LIU J., YU J., MCINTOSH L., KENDE H., ZEEVAART J.A., 2001b. Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiol* 125, 1821-1830.
- LIU C., ZHOU J., BRACHA-DRORI K., YALOVSKY S., ITO T., YU H., 2007. Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. *Development* 134, 1901-1910.
- LOCKE J.C.W., MILLAR A.J., TURNER M.S., 2005a. Modelling genetic networks with noisy and varied experimental data: the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *J Theor Biol* 234, 383-393.
- LOCKE J.C.W., SOUTHERN M.M., KOZMA-BOGNÁR L., HIBBERD V., BROWN P.E., TURNER M.S., MILLAR A.J., 2005b. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol* 1, E1-E9.
- LOCKE J.C.W., KOZMA-BOGNÁR L., GOULD P.D., FEHÉR B., KEVEI É., NAGY F., TURNER M.S., HALL A., MILLAR A.J., 2006. Experimental validation of a predicted feedback loop in the multi-oscillator clock of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol* 2, 59.
- MA L., ZHAO H., DENG X.W., 2003. Analysis of the mutational effects of the *COP/DET/FUS* loci on genome expression profiles reveals their overlapping yet not identical roles in regulating *Arabidopsis* seedling development. *Development* 130, 969-981.
- MAKINO S., KIBA T., IMAMURA A., HANAKI N., NAKAMURA A., SUZUKI T., TANIGUCHI M., UEGUCHI C., SUGIYAMA T., MIZUNO T., 2000. Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorylation and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41, 791-803.
- MAKINO S., MATSUSHIKA A., KOJIMA M., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2002. The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of *Arabidopsis thaliana*: I. Characterization with APRR1-overexpressing plants. *Plant Cell Physiol* 43, 58-69.
- MARTÍNEZ-GARCÍA J.F., HUQ E., QUAIL P.H., 2000. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288, 859-863.
- MARTÍNEZ-GARCÍA J.F., VIRGOS-SOLERA A., PRAT S., 2002. Control of photoperiod regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene *CONSTANS*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15211-15216.
- MAS P., 2005. Circadian clock signalling in *Arabidopsis thaliana*: from gene expression to physiology and development. *Int J Dev Biol* 49, 491-500.
- MAS P., DEVLIN P.F., PANDA S., KAY S.A., 2000. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408, 207-211.
- MAS P., ALABADÍ D., YANOVSKY M.J., OYAMA T., KAY S.A., 2003a. Dual role of TOC1 in the control of circadian

- and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 223-236.
- MAS P., KIM W.Y., SOMERS D.E., KAY S.A., 2003b. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 426, 567-570.
- MATHIEU J., WARTHMAN N., KÜTTNER F., SCHMID M., 2007. Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 17, 1055-1060.
- MATSUSHIKA A., MAKINO S., KOJIMA M., MIZUNO T., 2000. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators: insight into the plant circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 41, 1002-1012.
- MATSUSHIKA A., IMAMURA A., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2002. Aberrant expression of the light-inducible and circadian-regulated *APRR9* gene belonging to the circadian-associated APRR1/TOC1 quintet results in the phenotype of early flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43, 833-843.
- MATSUSHIKA A., MURAKAMI M., ITO S., NAKAMICHI N., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2007. Characterization of circadian-associated pseudo-response regulators: (I). Comparative studies on a series of transgenic lines mis-expressing five distinctive PRR genes in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 527-534.
- MCCLUNG C.R., 2006. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18, 792-803.
- MCWATTERS H.G., BASTOW R.M., HALL A., MILLAR A.J., 2000. The *ELF3 zeitnehmer* regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408, 716-720.
- MCWATTERS H.G., KOLMOS E., HALL A., DOYLE M.R., AMASINO R.M., GYULA P., NAGY F., MILLAR A.J., DAVIS S.J., 2007. ELF4 is required for oscillatory properties of the circadian clock. *Plant Physiol* 144, 391-401.
- MICHAELS S.D., HIMELBLAU E., KIM S.Y., SCHOMBURG F.M., AMASINO R.M., 2005. Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 137, 149-156.
- MILLAR A.J., 2004. Input signals to the plant circadian clock. *J Exp Bot* 55, 277-283.
- MILLAR A.J., CARRÉ I.A., STRAYER C.A., CHUA N.H., KAY S.A., 1995. Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267, 1161-1163.
- MIZOGUCHI T., WHEATLEY K., HANZAWA Y., WRIGHT L., MIZOGUCHI M., SONG H.R., CARRÉ I.A., COUPLAND G., 2002. *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2, 629-641.
- MIZOGUCHI T., WRIGHT L., FUJIWARA S., CREMER F., LEE K., ONOUCHI H., MOURADOV A., FOWLER S., KAMADA H., PUTTERILL J., COUPLAND G., 2005. Distinct roles of *GIGANTEA* in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 2255-2270.
- MIZOGUCHI T., NIINUMA K., YOSHIDA R., 2007. Day-neutral response of photoperiodic flowering in tomatoes: possible implications based on recent molecular genetics of *Arabidopsis* and rice. *Plant Biotech* 24, 83-86.
- MIZUNO T., 2004. Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Curr Opin Plant Biol* 7, 499-505.
- MIZUNO T., NAKAMICHI N., 2005. Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs). *Plant Cell Physiol* 46, 677-685.
- MOCKLER T.C., GUO H., YANG H., DUONG H., LIN C., 1999. Antagonistic actions of *Arabidopsis* cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development* 126, 2073-2082.
- MOCKLER T., YANG H., YUX H., PARIKH D., CHENG Y.C., DOLAN S., LIN C., 2003. Regulation of photoperiodic flowering by *Arabidopsis* photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2140-2145.
- MONTE E., TEPPERMAN J.M., AL-SADY B., KACZOROWSKI K.A., ALONSO J.M., ECKER J.R., LI J.R., ZHANG Y., QUAIL P.H., 2004. The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16091-16098.
- MURAKAMI M., ASHIKARI M., MIURA K., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2003. The evolutionarily conserved OsPRR quintet: rice pseudo-response regulators implicated in circadian rhythm. *Plant Cell Physiol* 44, 1229-1236.
- MURAKAMI M., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2004. Characterization of circadian-associated APRR3 Pseudo-Response Regulator belonging to the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 45, 645-650.
- MURAKAMI M., MATSUSHIKA A., ASHIKARI M., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2005. Circadian-associated rice pseudo response regulators (*OsPRRs*): information on the control of flowering time. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 410-414.
- MURAKAMI M., TAGO Y., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2007a. Comparative overviews of clock-associated genes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol* 48, 110-121.
- MURAKAMI M., TAGO Y., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2007b. Characterization of the rice circadian clock-associated pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1107-1110.
- NAKAMICHI N., KITA M., ITO S., SATO E., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2005a. The *Arabidopsis* pseudo-response regulators, PRR5 and PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant Cell Physiol* 46, 609-619.
- NAKAMICHI N., KITA M., ITO S., SATO E., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2005b. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46, 686-698.
- NAKAMICHI N., KITA M., NIIMURA K., ITO S., YAMASHINO T., MIZOGUCHI T., MIZUNO T., 2007. *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate

- flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiol* 48, 822-832.
- NAKAMURA Y., KATO T., YAMASHINO T., MURAKAMI M., MIZUNO T., 2007. Characterization of a set of phytochrome-interacting factor-like bHLH proteins in *Oryza sativa*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1183-1191.
- NELSON D.C., LASSWELL J., ROGG L.E., COHEN M.A., BARTEL B., 2000. *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101, 331-340.
- NEMOTO Y., KISAKA M., FUSE T., YANO M., OGIHARA Y., 2003. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice. *Plant J* 36, 82-93.
- NI M., TEPPERMAN J., QUAIL P., 1999. Binding of phytochrome B to its nuclear signaling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400, 781-784.
- NIINUMA K., NAKAGAWA M., CALVINO M., MIZOGUCHI T., 2007. Dance of plants with circadian clock. *Plant Biotech* 24, 87-97.
- NIWA Y., ITO S., NAKAMICHI N., MIZOGUCHI T., NIINUMA K., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2007. Genetic linkages of the circadian clock-associated genes, *TOC1*, *CCA1* and *LHY*, in the photoperiodic control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 48, 925-937.
- NOZUE K., COVINGTON M.F., DUEK P.D., LORRAIN S., FANKHAUSER C., HARMER S.L., MALOOF J.N., 2007. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448, 358-361.
- ODA A., FUJIWARA S., KAMADA H., COUPLAND G., MIZOGUCHI T., 2004. Antisense suppression of the *Arabidopsis PIF3* gene does not affect circadian rhythms but causes early flowering and increases *FT* expression. *FEBS Lett* 557, 259-264.
- ONAI K., ISHIURA M., 2005. *PHYTOCLOCK 1* encoding a novel GARP protein essential for the *Arabidopsis* circadian clock. *Genes Cells* 10, 963-972.
- ONOUCHI H., IGENO M.I., PERILLEUX C., GRAVES K., COUPLAND G., 2000. Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes. *Plant Cell* 12, 885-900.
- PARA A., FARRÉ E.M., IMAIZUMI T., PRUNEDA-PAZ J.L., HARMON F.G., KAY S.A., 2007. *PRR3* is a vascular regulator of *TOC1* stability in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 19, 3462-3473.
- PARK D.H., SOMERS D.E., KIM Y.S., CHOY Y.H., LIM H.K., SOH M.S., KIM H.J., KAY S.A., NAM H.G., 1999. Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene. *Science* 285, 1579-1582.
- PENG L.T., SHI Z.Y., LI L., SHEN G.Z., ZHANG J.L., 2007. Ectopic expression of *OsLFL1* in rice represses *Ehd1* by binding on its promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 251-256.
- PENG L.T., SHI Z.Y., LI L., SHEN G.Z., ZHANG J.L., 2008. Overexpression of transcription factor *OsLFL1* delays flowering time in *Oryza sativa*. *J Plant Physiol*, in press.
- PERALES M., MÁS P., 2007. A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the *Arabidopsis* biological clock. *Plant Cell* 19, 2111-2123.
- PIÑEIRO M., GÓMEZ-MENA C., SCHAFFER R., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M., COUPLAND G., 2003. *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS* is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing *FT*. *Plant Cell* 15, 1552-1562.
- PITTENDRIGH C.S., MINIS D.H., 1964. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *Am Natl* 98, 261-322.
- PORTOLÉS S., MÁS P., 2007. Altered oscillator function affects clock resonance and is responsible for the reduced day-length sensitivity of *CKB4* overexpressing plants. *Plant J* 51, 966-977.
- PUTTERILL J., ROBSON F., LEE K., SIMON R., COUPLAND G., 1995. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80, 847-857.
- PUTTERILL J., LAURIE R., MACKNIGHT R., 2004. It's time to flower: the genetic control of flowering time. *Bioessays* 26, 363-373.
- QUAIL P., 2002. Phytochrome photosensory signalling networks. *Natl Rev Mol Cell Biol* 2, 85-93.
- REED J.W., NAGPAL P., POOLE D.S., FURUYA M., CHORY J., 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 5, 147-157.
- ROBSON F., COSTA M.M.R., HEPWORTH S., VIZIR I., PIÑEIRO M., REEVES P.H., PUTTERILL J., COUPLAND G., 2001. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J* 28, 619-631.
- RODEN L.C., SONG H.R., JACKSON S., MORRIS K., CARRÉ I.A., 2002. Floral responses to photoperiod are correlated with the timing of rhythmic expression relative to dawn and dusk in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13313-13318.
- SALOMÉ P.A., MCCLUNG C.R., 2005. *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7* and *9* are partially redundant genes essential for temperature responsiveness of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell* 17, 791-803.
- SAMACH A., LOTAN H., 2007. The transition to flowering in tomato. *Plant Biotech* 24, 71-82.
- SAMACH A., ONOUCHI H., GOLD S.E., DITTA G.S., SCHWARZ-SOMMER Z., YANOFSKY M.F., COUPLAND G., 2000. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 288, 1613-1616.
- SATO E., NAKAMICHI N., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2002. Aberrant expression of the *Arabidopsis* circadian-regulated *APRR5* gene belonging to the *APRR1/TOC1*



- quintet results in early flowering and hypersensitiveness to light in early photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol* 43, 1374-1385.
- SAWA M., NUSINOW D.A., KAY S.A., IMAIZUMI T., 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science* 5848, 261-265.
- SCHAFFER R., RAMSAY N., SAMACH A., CORDEN S., PUTTERILL J., CARRÉ I.A., COUPLAND G., 1998. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* 93, 1219-1229.
- SCHULTZ T.F., KIYOSUE T., YANOVSKY M., WADA M., KAY S.A., 2001. A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 2659-2670.
- SEARLE I., COUPLAND G., 2004. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J* 23, 1217-1222.
- SEARLE I., HE Y., TURCK F., VINCENT C., FORNARA F., KROBER S., AMASINO R.A., COUPLAND G., 2006. The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20, 898-912.
- SEIJO Y., SULLIVAN J.A., WANG H., YANG J., SHEN Y., RUBIO V., MA L., HOECKER U., DENG X.W., 2003. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev* 17, 2642-2647.
- SEO H.S., YANG J.Y., ISHIKAWA M., BOLLE C., BALLESTEROS M.L., CHUA N.H., 2003. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 423, 995-999.
- SEO H.S., WATANABE E., TOKUTOMI S., NAGATANI A., CHUA N.H., 2004. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Dev* 18, 617-622.
- SHIN B.S., LEE J.H., LEE J.H., JEONG H.J., YUN C.C., KIM J.K., 2004. Circadian regulation of rice (*Oryza sativa* L.) *CONSTANS-like* gene transcripts. *Mol Cell* 17, 10-16.
- SOMERS D.E., 2005. Entrainment of the circadian clock. In: *Endogenous plant rhythms*. Annual Plant Reviews, vol 21 (Hall A., McWatters H., eds). Blackwell Publishing, Oxford, UK. pp. 85-105.
- SOMERS D.E., DEVLIN P., KAY S.A., 1998a. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282, 1488-1490.
- SOMERS D.E., WEBB A.A.R., PEARSON M., KAY S.A., 1998b. The short-period mutant, *tocl-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125, 485-494.
- SOMERS D.E., SCHULTZ T.F., MILNAMOW M., KAY S.A., 2000. *ZEITLUPE* encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101, 319-329.
- SOMERS D.E., KIM W.Y., GENG R., 2004. The F-box protein *ZEITLUPE* confers dosage-dependent control on the circadian clock, photomorphogenesis, and flowering time. *Plant Cell* 16, 769-782.
- SONG H.R., CARRÉ I.A., 2005. DET1 regulates the proteasomal degradation of LHY, a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Mol Biol* 57, 761-771.
- STAIGER D., ALLENBACH L., SALATHIA N., FIECHTER V., DAVIS S.J., MILLAR A.J., CHORY J., FANKHAUSER C., 2003. The *Arabidopsis* *SRR1* gene mediates phyB signaling and is required for normal circadian clock function. *Genes Dev* 17, 256-268.
- STRAYER C., OYAMA T., SCHULTZ T.F., RAMAN R., SOMERS D.E., MAS P., PANDA S., KREPS J.A., KAY S.A., 2000. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289, 768-771.
- SUÁREZ-LÓPEZ P., WHEATLEY K., ROBSON F., ONOUCHI H., VALVERDE F., COUPLAND G., 2001. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410, 1116-1120.
- SUGANO S., ANDRONIS C., GREEN R.M., WANG Z.Y., TOBIN E.M., 1998. Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11020-11025.
- SUGANO S., ANDRONIS C., ONG M.S., GREEN M., TOBIN E.M., 1999. The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12362-12366.
- TAKADA S., GOTO K., 2003. *TERMINAL FLOWER2*, an *Arabidopsis* homolog of *HETEROCHROMATIN PROTEIN1*, counteracts the activation of *FLOWERING LOCUS T* by *CONSTANS* in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* 15, 2856-2865.
- TAKAHASHI Y., SHOMURA A., SASAKI T., YANO M., 2001. Hd6, a rice quantitative trait locus involved in photoperiod sensitivity, encodes the subunit of protein kinase CK2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7922-7927.
- TAKANO M., KANEGAE H., SHINOMURA T., MIYAO A., HIROCHIKA H., FURUYA M., 2001. Isolation and characterization of rice *phytochrome A* mutants. *Plant Cell* 13, 521-534.
- TAKANO M., INAGAKI N., XIE X., YUZURIHARA N., HIHARA F., ISHIZUKA T., YANO M., NISHIMURA M., MIYAO A., HIROCHIKA H., SHINOMURA T., 2005. Distinct and cooperative functions of phytochromes A, B, and C in the control of deetiolation and flowering in rice. *Plant Cell* 17, 3311-3325.
- TAMAKI S., MATSUO S., WONG H.L., YOKOI S., SHIMAMOTO K., 2007. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316, 1033-1036.
- TEPPERMAN J.M., ZHU T., CHANG H.S., WANG X., QUAIL P.H., 2001. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9437-9442.
- THOMAS B., VINCE-PRUE B., 1997. *Photoperiodism in plants*, 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- TOURNOIS J., 1912. Influence de la lumière sur la floraison du houblon japonais et du chanvre déterminées par des semis haitifs. *CR Hebd Séanc Acad Sci Paris* 155, 297-300. [In French].

- TOURNOIS J., 1914. Études sur la sexualité du houblon. *Annis Sci Natl (Bot)* 19, 49-191. [In French].
- TURCK F., ROUDIER F., FARRONA S., MARTIN-MAGNIETTE M.L., GUILLAUME E., BUISINE N., GAGNOT S., MARTIENSSEN R.A., COUPLAND G., COLOT V., 2007. Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet* 3, e86, 855-866.
- TURNER A., BEALES J., FAURE S., DUNFORD R.P., LAURIE D.A., 2005. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science* 310, 1031-1034.
- VALVERDE F., MOURADOV A., SOPPE W., RAVENSCROFT D., SAMACH A., COUPLAND G., 2004. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303, 1003-1006.
- VICZIÁN A., KIRCHER S., FEJES E., MILLAR A.J., SCHÄFER E., KOZMA-BOGNÁR L., NAGY F., 2005. Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 for the *Arabidopsis thaliana* circadian clockwork. *Plant Cell Physiol* 46, 1591-1602.
- WANG Z.Y., TOBIN E.M., 1998. Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93, 1207-1217.
- WANG Z.Y., KENIGSBUCH D., SUN L., HAREL E., ONG M.S., TOBIN E.M., 1997. A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis Lhcb* gene. *Plant Cell* 9, 491-507.
- WENKEL S., TURCK F., SINGER K., GISSOT L., LE GOURRIEREC J., SAMACH A., COUPLAND G., 2006. CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2971-2984.
- WIGGE P.A., KIM M.C., JAEGER K.E., BUSCH W., SCHMID M., LOHMANN J.U., 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 309, 1056-1059.
- YAMAGUCHI A., KOBAYASHI Y., GOTO K., ABE M., ARAKI T., 2005. *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiol* 46, 1175-1189.
- YAMAMOTO Y., SATO E., SHIMIZU T., NAKAMICHI N., SATO S., KATO T., TABATA T., NAGATANI A., YAMASHINO T., MIZUNO T., 2003. Comparative genetic studies on the *APRR5* and *APRR7* genes belonging to the *APRR1/TOC1* quintet implicated in circadian rhythm, control of flowering time, and early photomorphogenesis. *Plant Cell Physiol* 44, 1119-1130.
- YAMAMOTO N., TSUGANE T., WATANABE M., YANO K., MAEDA F., 2005. Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene* 356, 127-134.
- YAMASHINO T., MATSUSHIKA A., FUJIMORI T., SATO S., KATO T., TABATA S., MIZUNO T., 2003. A link between circadian-controlled bHLH factors and the *APRR1/TOC1* quintet in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 44, 619-629.
- YANO M., KATAYOSE Y., ASHIKARI M., YAMANOUCHI U., MONNA L., FUSE T., BABA T., YAMAMOTO K., UMEHARA Y., NAGAMURA Y., 2000. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12, 2473-2484.
- YANO M., KOJIMA S., TAKASHI Y., LIN H., SASAKI T., 2001. Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiol* 127, 1425-1429.
- YANOVSKY M.J., KAY S.A., 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419, 308-312.
- YANOVSKY M., KAY S.A., 2003. Living by the calendar: how plants know when to flower. *Natl Rev Mol Cell Biol* 4, 265-276.
- YANOVSKY M.J., MAZZELLA M.A., CASAL J.J., 2000. A quadruple photoreceptor mutant still keeps track of time. *Curr Biol* 10, 1013-1015.
- YANOVSKY M.J., MAZZELLA M.A., WHITELAM G.C., CASAL J.J., 2001. Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *J Biol Rhythms* 16, 523-530.
- YASUHARA M., MITSUI S., HIRANO H., TAKANABE R., TOKIOKA Y., IHARA N., KOMATSU A., SEKI M., SHINOZAKI K., KIYOSUE T., 2004. Identification of ASK and clock-associated proteins as molecular partners of LKP2 (LOV kelch protein2) in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 55, 2015-2027.
- YOO B.C., KRAGLER F., VARKONYI-GASIC E., HAYWOOD V., ARCHER-EVANS S., LEE Y.M., LOUGH T.J., LUCAS W.J., 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 16, 1979-2000.
- ZEEVAART J.A., 2006. Florigen coming of age after 70 years. *Plant Cell* 18, 1783-1789.
- ZEILINGER M.N., FARRÉ E.M., TAYLOR S.R., KAY S.A., DOYLE F.J. 3<sup>rd</sup>, 2006. A novel computational model of the circadian clock in *Arabidopsis* that incorporates PRR7 and PRR9. *Mol Syst Biol* 2, 58.
- ZHANG X., CHEN Y., WANG Z.Y., CHEN Z., GU H., QU L.J., 2007. Constitutive expression of *CIR1 (RVE2)* affects several circadian-regulated processes and seed germination in *Arabidopsis*. *Plant J* 51, 512-525.
- ZHAO X.Y., LIU M.S., LI J.R., GUAN C.M., ZHANG X.S., 2005. The wheat *TaGIL*, involved in photoperiodic flowering, encodes an *Arabidopsis GI* ortholog. *Plant Mol Biol* 58, 53-64.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS. DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA