

Universidad Autónoma de Madrid

**REPRESIÓN FLORAL MEDIADA POR LA
CROMATINA EN *Arabidopsis thaliana*:**

**EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS
EBS Y SHL.**

Leticia López González, 2010

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**REPRESIÓN FLORAL MEDIADA POR LA
CROMATINA EN *Arabidopsis thaliana*:**

EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS HOMÓLOGAS

EBS Y SHL.

Memoria presentada por Leticia López González para optar al grado de Doctora por la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Codirectores de la Tesis: Manuel Angel Piñeiro Galvín y José Antonio Jarillo Quiroga

A Miguel.

No es fácil empezar esta hoja en blanco, hay tanta gente a la que le tengo que agradecer el haber llegado hasta aquí que me da miedo alargarme mucho y lo que sería peor, dejarme a alguien en el camino.

Supongo que lo mejor es empezar por el principio, nombrando a Roberto Solano que me puso en contacto con Manuel Piñeiro y José Antonio Jarillo, muchas gracias Roberto, realmente fue un gran consejo, porque tanto Manolo como José Antonio han sido mis jefes en el amplio sentido de la palabra, me han exigido mucho, pero también me han ayudado siempre con sabios consejos, buenas dosis de paciencia y sobre todo con cariño, creo y siento que el resultado ha sido el que los tres esperábamos y deseábamos. Y gracias a los dos por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación con sus luces y sus sombras y sobre todo por creer en mí cuando yo no lo hacía.

Y que sería de ese principio, sin el tan añorado y nombrado (y lo cito con mayúsculas) EDIFICIO Z del INIA. Creo que allí pasé una de las épocas más felices de mi vida con Adela, Marga, Chuchi, con compañeros y amigos como Mariano, Elena y Bruno con los que compartí películas, confidencias y que me dieron buenos consejos tanto científicos como personales. Con los niños de Julio Salinas, Rafa, Carlos, Tamara e Iñaki que nos dejaban un montón de cosas en los duros comienzos y a partir de ahí surgió una buena amistad que hoy en día intentamos mantener a pesar de no compartir edificio.

Y sobretodo con las niñas del Z. Cada una se merecería un párrafo y espero que entendáis que esto es tan sólo una pincelada de todo lo que tendría que decir. Empiezo por Ana que fue la primera a la que conocí y me pareció una listilla... gracias por tu ayuda científica inicial y por los estupendos momentos de después, espero que algún día celebres una boda como Dios manda y me invites. Sirvi que parece que no ha roto un plato y luego la sacas y es el alma de cualquier fiesta que se precie. Ángeles nuestra flamenca más internacional y anfitriona de los tan memorables ranchitos. Gracias a las dos por ese estupendo verano en Conil y ¡qué gane la mejor! Conchi, mucho más callada y observadora, siempre dispuesta a escucharte y consolarte. Gracias por acompañarme en el profundo hoyo día tras día. Lauri compañera de familia génica, de jefe y amiga, gracias por tu compañía y por recordarme cada vez que lo he necesitado, que soy la más lista del labo. Zamira que viene al CBGP cuando aún no han puesto las carreteras y que ahora se ha lanzado a incrementar los enormes atascos de la M40. Sara con su dulzura y su enorme corazón, demasiado grande a veces... Gemita Otri a la que seguimos echando muchísimo de menos y Gema la loca, que ha sido un apoyo incondicional y maravilloso en los últimos tiempos, escuchándome, cuidándome,

transportándome de Parla a Madrid y viceversa y siendo un punto de cordura y alegría en esta dura etapa final. Os quiero muchísimo a todas, ojalá esta etapa no terminase nunca... (pero sin tesis claro... y con un contrato indefinido y no con el actual temporal eventual).

Y con los niños del labo, Iván, Pablito y el pollito, que me han hecho pasar momentos memorables con el yutu. Iván gracias por tu ayuda con la tesis y gracias por las interminables chapas que nunca sé hacia dónde van a derivar. Pablito banda sonora del laboratorio y sonrisa asegurada durante la dura jornada laboral. Y el pollito que prácticamente acaba de nacer y ya es imprescindible para mí.

Quiero hacer un apartado especial para Deiviz, sin él esta tesis no existiría o al menos sería bastante peor. Deiviz gracias por tu ayuda científica, por aguantar mis chapas, y por no mandarme a la mierda cuando te pedía un millón de cosas a la vez, en definitiva, gracias por ser mi amigo, te echo muchísimo de menos. ¡VUELVE!

Y a todos lo que día a día me acompañaron e hicieron que el labo fuese un lugar mejor... Ignacio y Julieta, Carlos ese “pozo sin fin” de conocimiento, Sandra, Nuria... Gracias a todos por haberme acompañado tanto en los duros experimentos como en las estupendas fiestas, viajes y cañas varias.

Por último, quisiera agradecer a todas esas personas que han estado conmigo desde el principio (porque aunque no lo parezca hubo un a.Z. (antes del Z)), y que espero sigan estando para siempre. Mis amigas de Astorga, Vane, Cris y especialmente Boni; Mi casi hermana Moni; Mi familia, Chelo, Paco, Ginés y el Chirlicosbi, a los que debo tanto que es imposible expresarlo con palabras; Y especialmente a Alfredo, mi... todo, que aunque odia mi tesis...del odio al amor sólo hay un paso.

Gracias a todos por aguantarme cuando ni yo misma me aguantaba.

INTRODUCCIÓN	7
1. El control genético de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
1.1 La ruta dependiente del fotoperiodo.....	11
1.2 La ruta de la vernalización... ..	13
1.3 La ruta de la temperatura ambiente.....	14
1.4 La ruta autónoma.....	15
1.5 La ruta de la edad.....	16
1.6 La ruta de las giberelinas.....	17
2. Regulación de la floración mediada por los integradores florales.....	18
3. Papel de la remodelación de la cromatina en la floración.....	24
3.1 Control epigenético del represor floral <i>FLC</i> , un modelo de regulación de la expresión génica en plantas.....	26
3.1.1 Activación de <i>FLC</i>	27
3.1.2 Represión de <i>FLC</i> mediada por la exposición al frío.....	30
3.1.3 Otros represores de <i>FLC</i>	33
3.2 Remodelación de la cromatina en la regulación de otros genes de tiempo de floración.....	35
3.3 Control epigenético del integrador floral <i>FT</i>	36
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Material vegetal.....	42
2. Condiciones de cultivo de las plantas.....	43
3. Análisis fenotípicos.....	44
3.1 Medida del tiempo de floración.....	44
3.2 Medida de las fases del desarrollo vegetativo.....	45
3.3 Medida de caracteres morfológicos.....	45
4. Análisis genéticos.....	45
4.1 Métodos de manipulación y análisis de DNA genómico vegetal.....	45
5. Obtención de construcciones plasmídicas.....	47
5.1 Análisis del promotor de <i>EBS</i> y <i>SHL</i> en plantas transgénicas portadoras de las construcciones <i>EBS::GUS</i> y <i>SHL::GUS</i>	47
5.2 Clonación de las proteínas completas de <i>EBS</i> y <i>SHL</i> y de los dominios PHD de ambas en vectores de expresión.....	48
6. Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
7. Métodos histoquímicos.....	50
7.1 Ensayos histoquímicos para la visualización de β -glucuronidasa.....	50
8. Análisis de expresión.....	50
8.1 Extracción de RNA y análisis de mRNA.....	50
8.2 Reacción de la transcriptasa reversa seguida de amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	51
8.3 Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos.....	51
9. Ensayos de expresión de proteínas, purificación y pull-down.....	54
9.1 Expresión de proteínas recombinantes.....	54
9.2 Ensayos de interacción in vitro de las proteínas recombinantes a péptidos de histona H3 o a histonas de <i>Arabidopsis</i>	54
9.2.1 Ensayos de unión a los péptidos de Histona H3.....	54

9.2.2	Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a histonas de Arabidopsis	55
9.2.2.1	Extracción de las histonas de células en cultivo de Arabidopsis	55
9.2.2.2	Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a histonas	55
10.	Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina	56
RESULTADOS		59
1.	La familia de genes homólogos al represor floral <i>EBS</i> en Arabidopsis	60
2.	Caracterización funcional del gen <i>SHL/EBL1</i> en Arabidopsis	61
2.1	Análisis del patrón de expresión espacial de <i>SHL</i>	61
2.2	Análisis temporal de la expresión de <i>SHL</i>	63
2.3	Análisis funcional de <i>SHL</i>	64
2.4	Caracterización fenotípica de los mutantes <i>shl-2</i>	67
2.5	Análisis del tiempo de floración de los alelos <i>shl-1</i> y <i>shl-2</i> introgresados en fondos genéticos recíprocos	71
2.6	Análisis genético con mutantes <i>shl-2</i>	72
2.6.1	Estudio de la posible redundancia funcional de <i>SHL</i> y <i>EBS</i>	72
2.6.2	Interacción de <i>SHL</i> con las rutas de inducción de la floración	74
2.6.2.1	Interacción de <i>SHL</i> con la ruta del fotoperíodo	75
2.6.2.2	Interacción de <i>SHL</i> con la ruta autónoma	75
2.6.2.3	Interacción de <i>SHL</i> con la ruta de las giberelinas	77
2.6.3	Interacción de <i>SHL</i> con los integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i>	79
2.6.3.1	Interacción de <i>SHL</i> con los integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en condiciones de DL	79
2.6.3.2	Interacción de <i>SHL</i> con <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en condiciones de DC	80
2.6.3.3	Análisis del tiempo de floración de los triples mutantes <i>ebs shl-2 ft-1</i> y <i>ebs shl-2 soc1-1</i>	81
2.6.4	Interacción de <i>SHL</i> con los genes de identidad del meristemo floral <i>LFY</i> y <i>AP1</i>	82
3.	Papel de <i>SHL</i> en la regulación de genes reguladores del tiempo de floración	84
3.1	Análisis de la expresión del gen <i>CO</i> en los mutantes <i>shl-2</i>	84
3.2	Análisis de la expresión de <i>FVE</i> , <i>FLC</i> y genes <i>FLC-LIKE</i> en mutantes <i>shl-2</i>	86
3.3	Análisis de la expresión del gen <i>GA5</i> en los mutantes <i>shl-2</i>	88
3.4	Análisis de la expresión del gen <i>FT</i> en los mutantes <i>shl-2</i>	89
3.5	Análisis de la expresión del gen <i>TSF</i> en los mutantes <i>shl-2</i>	90
3.6	Análisis de la expresión de <i>SOC1</i> en los mutantes <i>shl-2</i>	91
3.7	Análisis de la expresión de genes implicados en el control del tiempo de floración en los dobles mutantes <i>ebs shl-2</i>	92
4.	Análisis de la posible interacción entre <i>SHL</i> y <i>EBS</i> con loci que codifican proteínas relacionadas con procesos de remodelación de cromatina	93
4.1	Interacción entre los loci <i>EBS</i> y <i>SHL</i> y <i>CLF</i>	93
4.2	Análisis de la expresión de los genes integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en los dobles mutantes <i>shl-2 clf-16</i> y <i>ebs clf-16</i>	96
4.3	Interacción entre <i>SHL</i> y <i>EBS</i> y el represor transcripcional <i>TFL2/LHP1</i>	97
4.4	Análisis de la expresión de los genes integradores florales <i>FT</i> y <i>SOC1</i> en los dobles mutantes <i>shl-2 tfl2-1</i> y <i>ebs tfl2-1</i>	98
5.	Análisis de la posible interacción de las proteínas <i>EBS</i> y <i>SHL</i> con residuos modificados de la histona H3	100
5.1	Ensayos de unión de <i>EBS</i> y <i>SHL</i> con péptidos biotinilados de la histona H3 modificados en la lisina 4	102
5.2	Ensayo de unión de <i>EBS</i> y <i>SHL</i> con histonas extraídas de células de Arabidopsis en	

cultivo.....	104
6. Regiones discretas de la cromatina de <i>FT</i> y <i>SOC1</i> están enriquecidas en H3K9,14 Ac en los mutantes <i>ebs</i> y <i>shl-2</i> respectivamente.....	105
6.1 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina del locus <i>SOC1</i> en mutantes <i>shl-2</i>	106
6.2 Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina del locus <i>FT</i> en los mutantes <i>ebs</i>	107
6.3 EBS se une a regiones reguladoras del integrador floral <i>FT</i>	109
DISCUSIÓN	111
1. Caracterización funcional del locus <i>SHL</i>	113
2. Interacción de <i>EBS</i> y <i>SHL</i> con otros remodeladores de cromatina de Arabidopsis.....	120
3. Caracterización de la función bioquímica de las proteínas EBS y SHL.....	122
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXO 1	
ANEXO 2	

ABRC	Arabidopsis Biological Resource Center of Ohio State University.
α -32P-dCTP	α -32P- Deoxicitidina trifosfato.
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence.
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid.
dCAPS	Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences.
DNA	Deoxyribonucleic Acid.
EST	Expressed sequence tag.
GFP	Green fluorescent protein.
GM	Growth medium.
GST	Glutathione S-transferase.
GUS	β -D-glucuronidase.
INDEL	Insertion/deletion Polymorphism.
Kb	Kilobase
μ E m-2 s-1	μ Einsteins m-2 s-1.
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid.
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid.
MS	Murashige y Skoog.
NASC	Nottingham Arabidopsis Centre.
NCBI	Nacional Center of Biotechnology Informa tion.
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.
r.p.m	revoluciones por minuto.
RNA	Ribonucleic acid.
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR.
TBE	Tris/Borato/EDTA.
T-DNA	Transferred DNA.
UTR	Unstranlated Region.
v/v	volumen/volumen.

Chromatin remodelling processes are essential for the establishment and maintenance of gene expression patterns that regulate plant development. In this work, we have addressed the molecular characterization of two *Arabidopsis* homologues, *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS* (*EBS*) and *SHORT LIFE* (*SHL*), involved in the chromatin-mediated repression of flowering. Both loci encode plant specific transcriptional regulators with identical modular architecture, characterised by the presence of two domains (BAH and PHD) frequently found in chromatin remodelling factors. Previous results have shown previously that *EBS* is required to repress the expression of the floral integrator *FT*. As for *EBS*, *SHL* is necessary to delay flowering, mainly under non-inductive photoperiodic conditions. However, genetic and molecular analyses indicate that *SHL* has independent roles from *EBS* in the control of the floral transition, and in contrast to *EBS*, *SHL* appears to be required for *SOC1* but not for *FT* repression. *EBS* and *SHL* proteins can bind in vitro histone H3 peptides when di- or trimethylated in the lysine 4 residue. Site-directed mutagenesis of conserved residues within the PHD domain abolish the binding of both proteins to H3K4me3, suggesting that the PHD motifs in *EBS* and *SHL* are responsible for the recognition of this histone modification. Additionally, *ews* and *shl* mutations cause increased levels of histone acetylation in the chromatin of *FT* and *SOC1* respectively, indicating that these two BAH-PHD-containing proteins are required to maintain an inactive chromatin conformation in their target genes. Altogether, these observations suggest a role for *EBS* and *SHL* in modulating the expression of the floral integrators *FT* and *SOC1* through a mechanism involving chromatin remodelling processes.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles que han desarrollado mecanismos para percibir las señales ambientales y adaptar su desarrollo a los cambios que se producen en el medio ambiente (Jarillo et al., 2008). El éxito reproductivo de las especies vegetales depende de que la transición floral, es decir el paso de desarrollo vegetativo a desarrollo reproductivo, ocurra en un momento adecuado del desarrollo y cuando las condiciones ambientales sean óptimas (Kobayashi y Weigel, 2007). Por ello, la transición floral es un proceso finamente regulado y el momento en que tiene lugar depende tanto de factores ambientales como de factores endógenos (Simpson y Dean, 2002; Bäurle y Dean, 2006; Kobayashi y Weigel, 2007; Jarillo et al., 2008). Los factores endógenos están relacionados fundamentalmente con el estado de desarrollo de la planta, mientras que los principales factores ambientales que regulan el momento de la floración son el fotoperiodo (relación entre los períodos diarios de luz y de oscuridad), la intensidad y la calidad de la luz que recibe la planta, y la temperatura. Las plantas disponen de mecanismos moleculares que les permiten percibir dichos estímulos medioambientales, y responder a las condiciones más adecuadas, iniciando el programa de desarrollo reproductivo. Entre las especies sensibles a fotoperiodo se pueden distinguir dos tipos de plantas. Aquellas en las que la floración se induce en condiciones de día corto (DC), donde el período diario de luz es más corto que el de oscuridad, como el arroz (*Oryza sativa*), y aquellas en las que se induce por exposición a días largos (DL), donde el período diario de iluminación es más largo que el de oscuridad como ocurre con la avena (*Avena sativa*). Otras especies de plantas como el tomate (*Solanum lycopersicum*) muestran una respuesta neutra a la duración del día y son insensibles al fotoperiodo (Jarillo et al., 2008). Además de la respuesta a fotoperiodo, es frecuente entre las plantas de climas templados que la floración de primavera dependa de una exposición prolongada a bajas temperaturas, fenómeno que se conoce como vernalización (Kim et al., 2009). Entre las especies que responden a vernalización, algunas muestran un requerimiento absoluto para florecer mientras que otras son facultativas, siendo capaces de responder a la exposición prolongada a bajas temperaturas, pero sin que esto constituya un requerimiento obligado (Kim et al., 2009).

1. El control genético de la floración en *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una planta facultativa de DL, es decir, florece antes en DL, aunque en DC también es capaz de florecer; además, algunas accesiones de *Arabidopsis* son capaces de responder a tratamientos de vernalización (Martínez-Zapater et al., 1994). *Arabidopsis* presenta una fase de desarrollo vegetativo en roseta caracterizada por la formación reiterada de hojas 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; Mc Daniel et al., 1992), y se ha asociado con cambios en la morfología de las hojas y en el patrón de distribución de los tricomas en las mismas (Telfer et al., 1997). Cuando se induce la transición floral, se produce la elongación de los entrenudos y la formación de una inflorescencia. Asimismo, los meristemas axilares de las hojas se desarrollan dando lugar a inflorescencias laterales o coflorescencias, con flores en el extremo superior.

Durante las dos últimas décadas se ha abordado la disección genética y molecular de los circuitos reguladores que controlan el inicio de la floración, empleando *Arabidopsis* como modelo. El análisis de la variación natural existente entre distintas accesiones y la caracterización de mutantes de *Arabidopsis* afectados en el tiempo de floración han permitido identificar una serie de genes que participan en la regulación de este proceso.

Las poblaciones naturales de *Arabidopsis* presentan una considerable variación para el tiempo de floración, probablemente como consecuencia de procesos de adaptación a distintas condiciones ambientales. Un ejemplo de ello son los distintos requerimientos de vernalización que muestran diferentes accesiones de *Arabidopsis*. Entre ellas existen variedades anuales de verano que germinan en primavera y completan la formación de flores y frutos antes de final de verano, mientras que otras se comportan como variedades anuales de invierno, que germinan en otoño y florecen en la primavera siguiente, tras la exposición prolongada al frío durante el invierno. Se ha demostrado que alelos funcionales y dominantes de los loci *FRIGIDA* (*FRI*) y *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) son los responsables fundamentales del requerimiento de vernalización en *Arabidopsis* (Johanson et al., 2000; Shindo et al., 2005; Werner et al., 2005). El análisis de variantes genéticas naturales ha permitido identificar asimismo otros genes y alelos implicados en la regulación del tiempo de floración en respuesta a factores como la temperatura o el fotoperiodo. Entre ellos se encuentran *EARLY DAYLENGTH INSENSITIVE/CRYPTOCHROME 2* (*EDI/CRY2*), *PHYTOCHROME C* y *D* (*PHY C* y *D*) y *FLOWERING LOCUS M/MADS AFFECTING FLOWERING 1* (*FLM/MAF1*) (Aukerman et al., 1997; el-Assal et al., 2001;

Werner et al., 2005; Balasubramanian et al., 2006a, 2006b). *PHYD* actúa como un represor floral, mientras que *CRY2* es un inductor de la floración. Ambos codifican apoproteínas de fotorreceptores de luz roja y luz azul, respectivamente. Por su parte, *PHYC* codifica la apoproteína del fitocromo C, otro receptor de luz roja que participa en la regulación del tiempo de floración en función de la latitud, contribuyendo a la variación natural de la floración en *Arabidopsis* (Balasubramanian et al., 2006a). Por último, *FLM/MAF1* codifica un factor de transcripción que actúa modulando la inducción de la floración en respuesta a pequeños aumentos de la temperatura de crecimiento (Balasubramanian et al., 2006b).

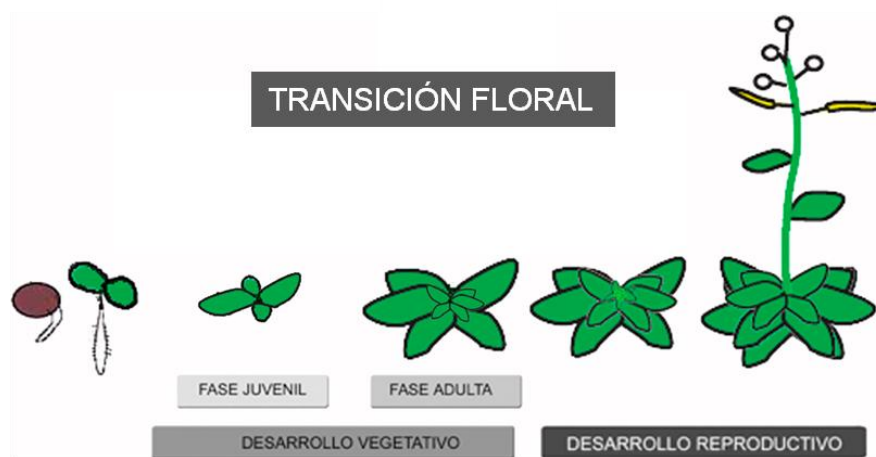


Fig 1. Transición de desarrollo vegetativo a reproductivo en *Arabidopsis thaliana*. Después de la germinación, el desarrollo de la planta atraviesa una fase vegetativa juvenil y una adulta. Posteriormente el meristemo sufre la transición del desarrollo vegetativo al reproductivo, y comienza la producción de flores en lugar de hojas.

Además de la variación genética existente en la naturaleza, el análisis genético de mutantes de floración inducidos artificialmente y el estudio de su respuesta a distintas condiciones ambientales han permitido proponer una serie de rutas genéticas de inducción de la floración en *Arabidopsis* (Searle y Coupland, 2004; Ausín et al., 2005; Amasino, 2010; Ko et al., 2010; Fornara et al., 2010). Entre ellas se encuentran algunas que median la respuesta a factores ambientales como las del fotoperiodo y la vernalización, que regulan la transición floral en respuesta a la duración del día y a la exposición prolongada a temperaturas bajas, respectivamente, y la ruta de la temperatura ambiente, que responde a la temperatura de crecimiento. Otras, en cambio, como la autónoma y las dependientes de la edad o de las giberelinas, no responden a las condiciones ambientales, sino a factores endógenos (Jackson et al., 2009; Kim et al., 2009; Mutasa-Gottgens y Hedden, 2009; Michaels, 2009; Wang et al., 2009). Estas rutas y otras que median respuestas dependientes de la luz (Valverde et al., 2004) o de distintos estreses (Martínez et al., 2004) convergen en la regulación de una serie de genes

denominados integradores florales, que son los que controlan en último término la transición de desarrollo vegetativo a desarrollo reproductivo (Fornara et al., 2010). Dichos integradores florales son principalmente *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1/AGAMOUS LIKE 20 (SOC1/AGL20)* y *AGAMOUS LIKE 24 (AGL24)* (Turk et al., 2008), y permiten modular con precisión el momento de inicio de la floración en respuesta tanto a las señales endógenas como a las medioambientales.

1.1 La ruta dependiente del fotoperiodo.

La ruta de fotoperiodo se definió clásicamente en base al fenotipo de mutantes que mostraban un retraso severo de la floración en condiciones de DL y escaso o nulo efecto en condiciones de DC; ninguno de estos mutantes mostraba alteraciones en su respuesta de vernalización. En esta ruta se incluyeron inicialmente genes como *FHA (CRY2)*, *GIGANTEA (GI)*, *CONSTANS (CO)*, *FT* y *FLOWERING LOCUS D (FD)* (Searle y Coupland, 2004), aunque estudios posteriores han desvelado los diversos mecanismos celulares implicados en la inducción floral en respuesta a DL (Fornara et al., 2010). Por otro lado, la sobreexpresión de la mayoría de estos genes causa fenotipos de floración temprana independientemente del fotoperiodo (Kardailsky et al, 1999; Kobayashi et al, 1999; Borner et al, 2000; Lee et al, 2000; Onouchi et al, 2000; Samach et al, 2000; Putterill et al., 2004; Bäurle y Dean, 2006). La capacidad de las plantas para responder al fotoperiodo requiere un mecanismo para detectar la longitud del día. En *Arabidopsis*, que es una planta facultativa de DL, este mecanismo incluye la interacción de las señales percibidas por los fotorreceptores fitocromos, criptocromos y los receptores de luz azul de tipo F-box ZEITLUPE (ZTL) y FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1), con componentes del reloj circadiano. Además, el gen *CO* desempeña un papel crucial en la respuesta fotoperiódica de floración (Hayama y Coupland, 2004), y tanto la regulación transcripcional de este gen como la estabilidad de la proteína *CO* son esenciales en el control de este proceso. La transcripción de *CO* muestra una oscilación diaria, y está controlada por el reloj circadiano; su expresión es baja durante las primeras horas del día y aumenta a las 10-12 horas después del amanecer, para alcanzar un pico aproximadamente a las 16 horas (Amasino, 2010). La proteína *CO* sólo es estable en presencia de la luz, degradándose en la oscuridad (Valverde et al., 2004). El RNAm de *CO* se acumula a última hora de la tarde en DL, mientras que en DC la expresión de *CO* tiene lugar en oscuridad, por lo que solo en DL se produce y acumula la proteína *CO* para inducir el inicio de la floración activando la expresión de los integradores florales, fundamentalmente *FT* y *TSF* (Samach et al., 2000; Yamaguchi et al., 2005; Wigge et al., 2005). El ritmo diario de expresión de *CO* depende del reloj circadiano, que es

responsable de los patrones diarios de expresión de aproximadamente el 30% de los genes de *Arabidopsis*, y comprende tres bucles interconectados entre sí (Imaizumi, 2009). El bucle central está compuesto por los factores de transcripción CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) y LATE ELONGATED HYPOCOTIL (LHY), que reprimen la transcripción de *TIMING OF CAB 1 (TOC1)* (Mas et al., 2003). *TOC1* codifica una proteína de tipo pseudo response regulator (PPR) que a su vez activa la transcripción de *CCA1* y *LHY*. Al menos otros dos bucles interaccionarían con CCA1/LHY y TOC1. Uno de ellos tendría lugar por la mañana, incluyendo a PRR7/PRR9 y otro por la noche, que incluiría a GI (Imaizumi, 2009). Además la expresión de *CCA1/LHY* depende de al menos otros cuatro genes expresados con *TOC1* por la tarde: *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, *ELF4*, *GI* y *LUX ARRHYTHMO (LUX)*. Mutaciones en *ELF3*, *ELF4* y *LUX* causan un fenotipo de floración temprana mientras que mutaciones en *GI* exhiben un fenotipo de floración tardía (Jarillo et al., 2008).

El patrón de oscilación diaria que sufre el mRNA de *CO* requiere además otras proteínas que a su vez también están reguladas por el reloj. CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1) es un factor de transcripción que actúa como un regulador negativo de *CO*, uniéndose a su promotor. La expresión de *CDF1* tiene un pico por la mañana, cuando los niveles de *CO* son bajos (Fowler et al., 1999; Imaizumi et al., 2003, 2005). Por el contrario, *GI* y *FKF1* tienen picos de expresión a última hora de la tarde y son esenciales para el aumento de expresión de *CO* a esa hora del día. *FKF1*, una subunidad de un complejo ubiquitina-ligasa, y *GI* formarían un complejo dependiente de luz azul, que a su vez se uniría a *CDF1*, marcándolo para su degradación por el proteasoma 26S y eliminando así la represión de *CO* (Sawa et al., 2007).

La señal lumínica tiene otras funciones en la respuesta fotoperiódica de floración además de modular la degradación de *CDF1*, ya que afecta a la estabilidad de otros componentes del reloj como *TOC1* (Kim et al., 2007b). Asimismo, la luz regula la estabilidad de la proteína *CO* (Valverde et al., 2004). La luz roja a través de *phyB* promueve la degradación de *CO* por el proteasoma, mientras que la luz roja lejana y la luz azul incrementan su estabilidad a través de *phyA* y de los criptocromos (Valverde et al., 2004). En oscuridad, la proteína *CO* es degradada por CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (*COP1*) (Jang et al., 2008), una proteína E3 ubiquitina ligasa de tipo RING finger, que regula la estabilidad de factores de transcripción implicados en las respuestas de las plantas a la luz (Osterlund et al., 2000; Holm et al., 2001; Seo et al., 2003). La actividad de *COP1* es mayor en oscuridad, como resultado de la exclusión de *COP1* del núcleo por la luz, mediada por los criptocromos (Liu et al., 2008). En la degradación de *CO* mediada por *COP1* también participan miembros de la familia de proteínas SUPRESOR

OF PHYTOCHROME A-105 (SPA), que se unen tanto a CO como a COP1, regulando la actividad ubiquitina ligasa de éste último (Saijo et al., 2003; Laubinger et al., 2006) (Fig. 2).

1.2 La ruta de la vernalización.

La exposición de plantas a periodos prolongados de bajas temperaturas no provoca una inducción inmediata de la floración, sino que las plantas vernalizadas adquieren la competencia para florecer posteriormente. El requerimiento de vernalización que muestran las variedades de invierno impide la floración en otoño y facilita la transición floral en primavera. La vernalización es además una respuesta cuantitativa en la que la aceleración de la floración es proporcional al tiempo de exposición al frío (Amasino, 2005). El lapso de tiempo que se produce entre la percepción de las bajas temperaturas y la inducción floral implica que las plantas vernalizadas “recuerdan” la exposición al frío, lo que sugirió que esta respuesta estaría mediada por mecanismos de regulación epigenética (Sung y Amasino., 2006; Dennis y Peacock, 2007; Schmitz y Amasino, 2007; Jarillo et al., 2009; Kim et al., 2009).

Como se comentó anteriormente, en *Arabidopsis* el requerimiento de vernalización depende de alelos dominantes de *FRI* y *FLC* (Koornneef et al., 1994; Lee et al., 1993). *FRI* codifica una proteína exclusiva de plantas (Johanson et al., 2000) que podría interactuar con la proteína de unión a la caperuza (CAP) del RNAm de *FLC*, regulando sus niveles de expresión (Geraldo et al., 2009). Por su parte, *FLC* codifica una proteína de tipo MADS-box que reprime la transición floral (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999). *FLC* reprime la floración regulando negativamente la expresión de los integradores florales *FT*, *FD* y *SOC1* (Lee et al., 2000; Samach et al., 2000; Hepworth et al., 2002; Helliwell et al., 2006; Searle et al., 2006) uniéndose a las regiones promotoras de *SOC1* y *FD* y al primer intrón de *FT* (Searle et al., 2006). Esta unión posiblemente atenúa la capacidad de la ruta del fotoperiodo para activar a los integradores florales (Kim et al., 2009).

La ruta de la vernalización actúa reprimiendo fuertemente la expresión del represor floral *FLC* a través de una serie de modificaciones esenciales de las histonas que afectan al estado de la cromatina del locus *FLC* (He y Amasino 2005; Sung y Amasino 2005; Schmitz y Amasino, 2007). Una vez que la planta ha sido vernalizada, la represión de *FLC* es estable durante el resto del ciclo de vida de la planta y los niveles altos de expresión de *FLC* sólo se restablecen en la siguiente generación (revisado por Schmitz y Amasino, 2007; Sheldon et al., 2008). El aislamiento y caracterización de mutantes con alteraciones en la respuesta de vernalización ha permitido identificar una serie de genes implicados en esta ruta (Kim et al.,

2009). Entre ellos se encuentra *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)*, otros miembros de la familia de factores homólogos a *VIN3*, tales como *VERNALIZATION 5/VIN3-LIKE1 (VRN5/VIL1)* y *VIL2/VEL1* así como proteínas pertenecientes al complejo *POLYCOMB-GROUP REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2)*, tales como *VRN2* (Gendall et al., 2001; Levy et al., 2002; Wood et al., 2006; Greb et al., 2007; de Lucia et al., 2008) (Fig. 2), confirmando el papel central de procesos de remodelación de cromatina en la respuesta de vernalización. La regulación epigenética de este proceso será discutida en detalle en la sección 4.1.2.

Recientemente se ha demostrado que los niveles de transcritos antisentido de *FLC*, denominados *COOLAIR* se incrementan de forma considerable y rápidamente en respuesta a los tratamientos de frío (Swiezewski et al., 2009), aunque por el momento no está claro el papel que estos transcritos no codificantes desempeñan en el control de la vernalización (Amasino y Michaels, 2010). Asimismo, se ha demostrado que en el proceso de vernalización se requieren determinados factores con dominios B3 capaces de unirse a DNA como *VRN1* (Levy et al., 2002); no se ha establecido el papel de *VRN1* en la regulación de *FLC* en respuesta al frío aunque se ha propuesto que podría desempeñar un papel similar al de complejos *PRC1* en organismos animales (Amasino y Michaels, 2010).

1.3 La ruta de la temperatura ambiente.

La floración de *Arabidopsis* es también sensible a la temperatura ambiental de crecimiento; plantas cultivadas a temperaturas altas (23°C) florecen antes que aquellas cultivadas a temperaturas más bajas (16°C). En *Arabidopsis* la percepción de la temperatura ambiental depende de una ruta termosensible que requiere la actividad de los genes *FVE* y *FCA* (Blázquez et al., 2003). Además, se ha propuesto que *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, que codifica otro factor de transcripción de tipo MADS box, media el papel de estos genes en la ruta de control de la floración dependiente de la temperatura ambiente ya que el mutante *svp* es insensible a las fluctuaciones de temperatura cercanas a la temperatura normal de crecimiento (Lee et al., 2007a). El mutante *svp* presenta niveles elevados de *FT*, tanto a 23°C como a 16°C, lo que indica que la vía de señalización dependiente de la temperatura funciona, al menos en parte, a través de *FT* (Lee et al., 2007a). Además, *SVP* se une a una caja *CArG* del promotor de *FT* para reprimir su expresión (Li et al., 2008). *SVP* también reprime directamente la expresión de *SOC1* en el meristemo apical del tallo (*SAM*) y en la hoja (Li et al., 2008) y comparte con *FLC* las mismas zonas de unión a los promotores de *SOC1* y *FT*. Así, durante el desarrollo vegetativo, *SVP* interacciona in vivo con *FLC* y sus funciones en el control de la floración son mutuamente dependientes (Li et al., 2008) (Fig. 2).

Recientemente se ha publicado que la distribución de la variante histónica H2A.Z varía con la temperatura, de tal manera que a bajas temperaturas aumentan los niveles de H2A.Z en los nucleosomas de determinados genes y este efecto es independiente de la transcripción. El aumento de H2A.Z provoca una reducción en los niveles de expresión de dichos genes dianas, bien porque se impida el progreso de la RNA pol II o bien porque se ocupen determinados elementos “cis” imprescindibles para la transcripción. En aquellos genes que se transcriben a bajas temperaturas, se piensa que la distribución de H2A.Z dificulta el acceso de determinados represores, o que compite con la metilación del DNA (Kumar y Wigge, 2010). FVE parece un buen candidato para regular la ruta dependiente de la temperatura modulando la distribución de H2A.Z, posiblemente modificando los niveles de acetilación en la cromatina de sus genes diana (Thambirajah et al., 2006; Ishibashi et al., 2009). En un análisis global de la distribución de H2A.Z (Zilberman et al., 2008), se demostró que el promotor de *FT* presentaba altos niveles de esta variante histónica. Posteriormente se analizó si la distribución de la misma en el promotor de *FT* variaba con la temperatura y se comprobó que la presencia de H2A.Z disminuye en el promotor de *FT* al aumentar la temperatura. Se ha propuesto que la disminución de H2A.Z en el promotor de *FT* podría explicar la inducción de la expresión de este gen integrador floral en respuesta a temperaturas altas de crecimiento (Kumar y Wigge, 2010).

1.4 La ruta autónoma.

Los genes implicados en la ruta autónoma se identificaron a partir de mutantes con un fenotipo de floración tardía tanto en condiciones de DL como en condiciones de DC, lo cual indica un papel en la inducción de la floración independiente del fotoperiodo. El fenotipo de floración tardía de estos mutantes se relaciona con niveles altos del mRNA de *FLC* y se revierte por vernalización (Koorneef et al., 1991); además, las mutaciones en el locus *FLC* suprimen el fenotipo tardío de los mutantes de esta ruta (Michaels y Amasino, 2001). Estos resultados han permitido concluir que la función principal de esta ruta es regular negativamente la expresión de *FLC* (Michaels, 2009).

Se han identificado diferentes genes que participan en la ruta autónoma, tales como *LUMINIDEPENDES (LD)*, *FCA*, *FY*, *FPA*, *SWP1*, *FLOWERING LATE KH MOTIF (FLK)*, *FVE (AtMSI4)*, *RELATIVE OF EARLY FLOWERING6 (REF6)* y *SHK1-BINDING PROTEIN 1 (SKB1)* (revisado por Baurle y Dean, 2006; Schmitz y Amasino, 2007). Las mutaciones en los loci *FVE*, *FLD*, *SWP1/LDL1* y *REF6* provocan un aumento en la acetilación de determinados residuos de los extremos aminotermiales de las histonas H3 y H4 en la cromatina de *FLC* que son consistentes con los altos niveles de expresión de dicho locus (He et al., 2003; Jiang et al.,

2007; Krichevsky et al., 2007). FVE pertenece a la familia de proteínas MSI y participa en complejos de tipo histona deacetilasa (HDAC) (Ausín et al., 2004; Kim et al., 2004). *FLD* y *SWP1* codifican amino-oxidasas (He et al., 2003; Jiang et al., 2007; Krichevsky et al., 2007) homólogas a la proteína humana LYSINE-SPECIFIC DEMETHYLASE1 (LSD1/AOF2) (Lee et al., 2006), implicada en demetilar residuos de lisina 4 de la histona H3 (H3K4) (Jiang et al., 2007; Liu et al., 2007a), al igual que *REF6*, que codifica una proteína homóloga a las de la familia *jumonji* de metazoos (Noh et al., 2004; Shi et al., 2004; Tsukada et al., 2006). Por su parte, *SKB1* dimetila de forma simétrica la arginina 3 de la histona H4 (H4R3me2) (Pei et al., 2007; Wang et al., 2007a; Schmitz et al., 2008).

Por otro lado, los loci *FCA*, *FPA*, *FLK* y *FY* codifican proteínas implicadas tanto en la unión como en el metabolismo del RNA (Macknight et al., 1997; Schomburg et al., 2001; Lim et al., 2004; Mockler et al., 2004; Baurle y Dean, 2006). La proteína *FY* interacciona físicamente con *FCA* (Simpson et al., 2003; Baurle y Dean, 2006) y ésta regula negativamente su propia expresión de una forma dependiente de *FY* (Macknight et al., 2002; Quesada et al., 2003). También parece que *FLK* podría interactuar con *FCA/FY*, afectando a la poliadenilación de determinados genes (Lim et al., 2004). Finalmente, *LD* es una proteína nuclear con dominios similares a los encontrados en algunos factores transcripcionales (Mitchell y Tjian, 1989; Lee et al., 1994; Aukerman et al., 1999) (Fig. 2).

Los genes adscritos a la ruta autónoma no constituirían un circuito regulador lineal sino más bien un grupo de genes que a través de diversos mecanismos moleculares represores estarían implicados en establecer los niveles de expresión del represor floral *FLC* (Michaels, 2009).

1.5 La ruta de la edad.

Estudios de la transición entre la fase juvenil y la fase adulta de la planta han revelado el papel que el microRNA 156 (miRNA 156) desempeña en la promoción de la fase juvenil, tanto en *Arabidopsis* como en maíz, previniendo por lo tanto la floración precoz de la planta (Wu y Poethig, 2006; Chuck et al., 2007). Al mismo tiempo, la expresión de miRNA 172 promueve la floración, al menos en parte, reprimiendo la expresión de proteínas de tipo *APETALA-2* que actúan como represores de *FT* (Aukerman y Sakai, 2003; Jung et al., 2007; Mathieu et al., 2009). Los miR156 y miR172 tienen patrones de expresión temporal contrarios; mientras que los niveles del miR156 disminuyen a medida que avanza el estado de desarrollo de la planta, los del miR172 aumentan (Chuck et al., 2007; Wu et al., 2009). miR156 reprime la

expresión de genes de la familia *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE (SPL)*, que a su vez son reguladores positivos del miR172 (Wu et al., 2009). A medida que avanza el estado de desarrollo de la planta, disminuyen los niveles de expresión del miR156 y aumentan los de miR172 y por lo tanto los de algunos genes *SPL*, promoviendo la activación de *FT* en las hojas; además, el incremento de otras proteínas *SPL* en el meristemo, provoca también la activación de otros integradores florales como *SOC1*, *AGL24* y *FRUITFUL (FUL)* (Wang et al., 2009a), así como genes de identidad de meristemo floral como *LEAFY (LFY)* y *APETALA1 (AP1)* (Yamaguchi et al., 2009) (Fig. 2).

1.6 La ruta de las giberelinas.

Las giberelinas (GAs) son un tipo de hormonas reguladoras del crecimiento de plantas que afectan a muchos aspectos del desarrollo vegetal (Schwechheimer, 2008) y promueven la floración en varias especies de DL (Zeevaart, 1983; Bernier, 1988; Putterill et al., 1995), incluida *Arabidopsis* (Langridge, 1957; Chandler y Dean, 1994). De acuerdo con su papel inductor de la floración, la aplicación exógena de giberelinas en las hojas o ápices de *Arabidopsis* acelera el tiempo de floración (Langridge, 1957). Un efecto similar lo producen mutaciones que provocan una activación constitutiva de la transducción de señales de GAs, como *spindly (spy)*, que presenta un fenotipo de floración temprana tanto en DL como en DC (Silverstone et al., 2007). Por el contrario, mutaciones como *ga1-3*, que eliminan la síntesis de giberelinas, retrasan levemente el tiempo de floración en DL y suprimen completamente la floración en DC, indicando el papel esencial que tienen estas hormonas en el inicio de la floración en fotoperiodos no inductivos (Wilson et al., 1992). Las GAs actúan en parte a través de la desestabilización de una familia de proteínas denominada DELLA, que en *Arabidopsis* son cinco (Fleck y Harberd, 2002); al menos tres de ellas, GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) y RGA-LIKE 1 (RGL1) están implicadas en floración (Koorneef, 1985; Wilson et al., 1992; Fleck y Harberd, 2002). La ruta de inducción de la floración dependiente de las giberelinas actúa activando la expresión del integrador floral *SOC1* (Moon et al., 2003) y del gen de identidad de meristemo floral *LFY* (Blázquez y Weigel, 2000), teniendo un papel muy importante en la inducción de la floración en condiciones no inductivas de DC. Recientemente se ha establecido que las GAs también podrían actuar sobre *FT*, ya que GA₄, la forma activa de esta hormona, promueve la expresión de *FT* en los mutantes *ga1-3* (Hisamatsu y King, 2008). GA₄ también tiene una función independiente de *FT*, ya que rescata el fenotipo tardío del mutante *ft-1* en ambas condiciones de fotoperiodo. Este papel de las GAs sobre la

expresión de *FT* parece ser exclusivo de *Arabidopsis*, puesto que en *Lolium temulentum*, la aplicación de GAs no incrementa la expresión de *FT* ni en DL ni en DC (King et al., 2006).

La concentración de GA activa (GA₄) se incrementa en el meristemo justo antes de que ocurra la transición floral (Mutasa-Göttgens y Hedden., 2009). Es probable que GA₄ se desplace desde otras partes de la planta al meristemo, ya que, se detectan GAs en los peciolos en respuesta a la longitud del día antes de su aparición en el meristemo, lo que sugiere que los peciolos serían uno de los lugares de biosíntesis de GAs durante la inducción floral (Fornara et al., 2010).

2. Regulación de la floración mediada por los integradores florales.

Estudios recientes han puesto de manifiesto que las distintas rutas de inducción de la floración convergen a nivel de los llamados integradores florales entre los que se encuentran *FT*, *SOC1/AGL20* y *AGL24* (Turk et al., 2008).

Diversos estudios genéticos y moleculares sitúan la activación transcripcional del integrador floral *FT* bajo el control de la ruta de fotoperiodo, y concretamente de *CO* (Turck et al., 2008), que como hemos discutido es un regulador central de la respuesta fotoperiódica de floración en *Arabidopsis*. Plantas portadoras de mutaciones en *CO* muestran niveles reducidos del mensajero de *FT*, mientras que la sobreexpresión de *CO* provoca un aumento de la expresión de *FT* y aceleración de la floración (Turck et al., 2008). Como se comentó anteriormente, la proteína *CO* contiene un dedo de zinc de tipo B-box en su extremo aminoterminal y un motivo CCT en el extremo carboxilo (Jackson, 2009). El dominio B-box se ha implicado en el establecimiento de interacciones proteína-proteína, mientras que el dominio CCT tiene cierta homología con histonas y por ello podría tener capacidad de unión a DNA. De hecho, un estudio reciente ha demostrado que *CO* se une a regiones discretas de los promotores de *FT* y *TSF* a través del dominio CCT y que *CO* tiene actividad como activador transcripcional que depende de una región rica en glutamina situada entre los dominios CCT y B-box (Tiwari et al., 2010).

Estudios clásicos realizados en diversas especies vegetales que muestran sensibilidad a fotoperiodo establecieron que la duración del día se percibe en las hojas, y la inducción de la floración tiene lugar en el SAM, por lo que se postuló que debía existir alguna señal que se transmitiese desde la hoja hasta el meristemo para desencadenar el inicio de la floración (Corbesier et al., 2007). Experimentos clásicos de injerto demostraron que hojas expuestas a condiciones de fotoperiodo inductivas de la floración podían provocar la transición floral en

meritemos no inducidos, confirmando la existencia de una señal transmisible que inducía la floración, y a esta señal se la denominó “florigeno” (Chailakhyan, 1936). Un posible vínculo entre la hipótesis del florigeno y la actividad de CO y FT quedó patente cuando se desveló que ambos genes se expresan en células vasculares del floema (Takada y Goto., 2003; An et al., 2004; Ayre y Turgeon, 2004). La expresión de CO con promotores heterólogos proporcionó las primeras indicaciones de que CO actúa en las hojas y activaría una señal sistémica que viaja al meristemo apical; estos estudios mostraron que CO promovía la floración cuando se expresaba en las células del floema pero no cuando se expresaba en el meristemo apical (An et al., 2004; Ayre y Turgeon, 2004). Sin embargo, FT promovía la floración cuando se expresaba tanto en el floema como en el meristemo apical incluso en ausencia de CO funcional, confirmando que la señal de FT actúa por debajo de CO (An et al., 2004). Todas estas observaciones dieron lugar a la hipótesis de que FT podría ser o formar parte del florigeno (Corbesier et al., 2007; Jaeger y Wigge, 2007). De hecho, FT, una proteína de pequeño tamaño con homología a proteínas de la familia de inhibidores RAF kinasa (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999), se detectó por espectrometría de masas en el floema de *Brassica napus* y *Cucurbita máxima* (Giavalisco et al., 2006; Lin et al., 2007), y posteriormente en *Oryza sativa* y en *Arabidopsis*, se observó que la proteína FT se desplazaba intracelularmente desde el tejido vascular hasta el SAM para inducir el inicio de la floración (Corbesier et al., 2007; Lin et al., 2007).

Cuando la proteína FT alcanza el meristemo apical, interacciona con el factor de transcripción de tipo b-Zip FD y forma un complejo que activa la expresión de *SOC1* y de los genes de identidad de meristemo floral. Esta interacción es consistente con experimentos que demostraron que la mutación *fd* suprimía el efecto de la sobreexpresión de FT (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). Uno de los primeros marcadores moleculares de la transición de meristemo vegetativo a meristemo floral es la expresión del gen *SOC1* (Lee et al., 2000; Samach et al., 2000; Searle et al., 2006). El complejo FT/FD activa la expresión de *SOC1* (Michaels et al., 2005; Yoo et al., 2005) y de los genes de identidad de meristemo floral como *AP1*, *FUL* y *SEPALLATA 3 (SEP3)* (Abe et al., 2005; Moon et al., 2005; Wigge et al., 2005; Corbesier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007). De hecho, se ha demostrado que la expresión de *AP1* es muy baja en los mutantes *fd* (Abe et al., 2005a) y que no se detecta en los dobles mutantes *fd lfy*, ni *ft lfy*, lo que indica que el complejo FT/FD actúa redundantemente con LFY para activar la expresión de *AP1* (Ruiz-García et al., 1997; Samach et al., 2000; Abe et al., 2005a; Wigge et al., 2005). Del mismo modo, la sobreexpresión de FT causa expresión ectópica en las hojas de *AP1*, *FUL*, *SEP3* y *CAULIFLOWER (CAL)* (Abe et al., 2005a; Wigge et al., 2005), lo que no ocurre si se sobreexpresa en un fondo mutante *fd* (Teper-

Bamnolker et al., 2005). Estas observaciones han llevado a concluir que el heterodímero FT/FD regula en el meristemo apical la expresión de los genes *SOC1*, *AP1*, *FUL*, *SEP3* y *CAL*; además se ha propuesto la hipótesis de que FT podría interactuar con el promotor de *AP1*, a través de un dominio de unión a DNA presente en FD (Wigge et al., 2005) y que FT actuaría como coactivador transcripcional (Wigge et al., 2005), o bien como regulador postraducciona de FD en el núcleo (Abe et al., 2005a).

Estos estudios han revelado las bases moleculares que subyacen a la regulación temporal, pero también espacial, de la transición floral (Searle et al., 2006) (Fig. 2).

Se ha propuesto que además de FT, otras proteínas pertenecientes a la misma familia de proteínas con homología a inhibidores de quinasas de tipo Raf estarían implicadas en integrar señales que median respuestas de floración. Entre las proteínas homólogas a FT en *Arabidopsis*, *TSF* es la más cercana a FT con una 82% de identidad en su secuencia. Las plantas que sobrepresan *TSF* tienen un fenotipo de floración temprana como las plantas que sobrepresan *FT* (Kobayashi et al., 1999), lo que indicaría que ambos participan en el control de la transición floral en *Arabidopsis* (Araki et al., 2005). Aunque los mutantes *tsf* florecen sólo ligeramente más tarde que la planta silvestre, el doble mutante *ft tsf* es más tardío que el mutante sencillo *ft* en condiciones de DL, lo que sugiere cierta redundancia funcional entre ambos genes (Michaels et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005). Además, la transcripción de *FT* y *TSF* en condiciones de DL depende de la actividad de CO (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Samach et al., 2000; Yamaguchi et al., 2005). Por todo ello, se ha propuesto que *TSF* tendría un papel como integrador floral en *Arabidopsis* (Yamaguchi et al., 2005).

Otro miembro de la familia FT-LIKE es *TFL1* aunque su función en el control de la inducción floral es antagónica con la que desempeña FT (Kobayashi et al., 1999; Mimida et al., 2001). El mutante *tfl1* tiene un fenotipo de floración temprana con una parada prematura del desarrollo de la inflorescencia tras la producción de una flor terminal de forma similar a las plantas transgénicas que sobrepresan *FT* (Bradley et al., 1997; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999). Al contrario que *FT*, *TFL1* actúa como represor de la transición floral. De hecho se ha demostrado que *TFL1* podría competir con FT para formar un heterodímero con FD (Giakountis y Coupland, 2008; Weigel et al., 2006; Bradley et al., 2005), y que su papel es el mantenimiento del estado vegetativo (Bradley et al., 1997; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999).

Además de la ruta de fotoperiodo, otras rutas controlan los niveles de expresión de *FT*, que por tanto integra también otras señales medioambientales y endógenas. Se ha

demostrado que *FLC* reprime la expresión de *FT* en el tejido vascular de las hojas (Searle et al., 2006). Los niveles de expresión del represor floral *FLC* a su vez están controlados por la actividad de las rutas autónoma (Simpson et al., 2004) y de vernalización (He y Amasino 2005; Sung y Amasino 2005; Schmitz y Amasino, 2007), por lo que la señalización procedente de estas dos rutas también se integra a nivel de la transcripción de *FT*. Igualmente, las condiciones de temperatura ambiente modulan la expresión de *FT*, en una respuesta mediada por *SVP*. Este factor de transcripción se asocia a *FLC* para formar un complejo que se une tanto al promotor de *FT* como a su primer intrón reprimiendo su expresión (Lee et al., 2007a; Li et al., 2008). Asimismo, las GAs también parecen influenciar la expresión de *FT* (Hisamatsu y King, 2008), al igual que la ruta dependiente de la edad de la planta, que modula la transcripción de *FT* a través de represores de tipo AP-2 (Amasino, 2010). Por lo tanto, los niveles de expresión de *FT* en la hoja integran la información procedente de las diversas rutas de inducción de la floración en *Arabidopsis*, tanto las que median señales ambientales como endógenas.

Otro de los integradores florales es el gen *SOC1*, que codifica una proteína de tipo MADS-box, ampliamente conservada en Angiospermas, tanto mono como dicotiledóneas (Lee et al., 2000, 2004, 2008; Cseke et al., 2003; Ferrario et al., 2004; Nakamura et al., 2005). A diferencia de *FT*, *SOC1* se expresa en el meristemo apical del tallo, donde actúa como un regulador positivo de la floración en respuesta a distintas rutas genéticas de tiempo de floración. Como hemos discutido anteriormente, el complejo que forman las proteínas *FT* y *FD* activa la transcripción de *SOC1* en el meristemo apical, por lo que la señalización de floración dependiente de *FT* modula la expresión de *SOC1* (Amasino, 2010). Además, la expresión de *SOC1* está regulada negativamente por *FLC*, que reprime tanto su expresión como la del gen *FD* en el meristemo (Searle et al., 2006), de manera que este represor floral no solo impide la generación de la señal sistémica que induce a floración reprimiendo a *FT*, sino que también modula la capacidad del meristemo para responder a las señales inductoras de la floración (Searle et al., 2006). *SVP* interacciona directamente con *SOC1* en regiones a las que también se une *FLC*, por lo que se ha sugerido que un complejo *FLC-SVP* participaría en la represión de *SOC1* (Li et al., 2008).

Al igual que *FT*, *SOC1* también es activado por un mecanismo dependiente de la edad de la planta, en el que están involucrados *SPL9* (Wang et al., 2009) y los microRNA 156 y 172 (Wu et al., 2009). Los factores de transcripción *SPL* participan en las transiciones tanto de fase juvenil a adulta, como de fase vegetativa a reproductiva (Schwab et al., 2005; Wu y Poethig, 2006). Los *SPLs* están silenciados postranscripcionalmente por el miRNA156, que se expresa a altos niveles en la fase juvenil, de tal manera que los niveles de expresión de los factores de

transcripción SPLs aumentan con la edad de la planta (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009). La sobreexpresión de las proteínas SPLs acelera la transición floral, mientras que una disminución en su actividad la retrasa (Schwab et al., 2005; Wu y Poethig, 2006; Schwarz et al., 2008). Además SPL9, que tiene una baja expresión en los primeros estadios de la planta y va aumentando progresivamente y de forma independiente al fotoperiodo, se une al primer intrón de *SOC1*, sugiriendo que SPL9 es un regulador positivo de *SOC1* dependiente de la edad de la planta e independiente de *FT/FD* (Wang et al., 2009). Por otra parte, varias proteínas de tipo SPL en el meristemo, activan la expresión tanto de *SOC1* como de *AGL24* (Wang et al., 2009) (Fig. 2).

Finalmente, *SOC1* también integra la ruta de la inducción de la floración dependiente de las giberelinas, puesto que el mutante *soc1* tiene menor sensibilidad a las GAs, y la sobreexpresión de *SOC1* rescata el fenotipo del mutante *ga1-3* en condiciones de DC (Moon et al., 2003). Además, el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* con GAs provoca una inducción de la expresión de este integrador floral (Moon et al., 2003). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual las GAs regulan la expresión de *SOC1* es aún desconocido (Lee y Lee, 2010).

Además de los distintos mecanismos reguladores de la expresión de *SOC1* discutidos anteriormente, la actividad de este integrador floral también está regulada a nivel postranscripcional por la proteína de unión a RNA EARLY FLOWERING 9 (ELF9) (Song et al., 2009). Se ha propuesto que ELF9 funciona a través de un mecanismo denominado non-sense-mediated mRNA decay (NMD). Los mutantes *elf9-1* tienen un fenotipo de floración temprana especialmente en condiciones de DC, y este fenotipo se asocia con un incremento en la expresión de *SOC1*. Además, el fenotipo tardío del mutante *soc1* es epistático sobre la mutación *elf9-1*, demostrando que el fenotipo temprano de este mutante requiere de un gen *SOC1* funcional. La proteína ELF9 se une directamente al transcrito parcialmente procesado de *SOC1*, lo que provoca un recambio postranscripcional posiblemente a través de un mecanismo NMD (Song et al., 2009).

Por su parte, *AGL24* es otro factor de transcripción de tipo MADS-box que se puede considerar como un activador de la floración ya que los mutantes *agl24* presentan un fenotipo de floración tardía, que es sólo ligeramente suprimido por la vernalización, aunque en mayor medida que en los mutantes *soc1* (Michaels et al., 2003b). Se ha descrito que *SOC1* y *AGL24* activan su expresión de forma recíproca (Michaels et al., 2003b; Yu et al., 2002) y trabajos recientes sugieren que la proteína citosólica *SOC1* se transloca al núcleo tras su interacción con

AGL24; este complejo SOC1-AGL24 activaría directamente la expresión de *LFY*, uniéndose a la región proximal de su promotor (Lee et al., 2008; Liu et al., 2008b). También se ha descrito que el efecto de las GAs sobre la floración en condiciones de DC está mediado por la interacción entre ambos factores (Liu et al., 2008b). Por lo tanto *AGL24* puede funcionar como otro integrador floral, que participa junto a *SOC1* en la activación de *LFY*. *AGL24* también es regulado en el meristemo por proteínas SPLs reguladas a su vez por miR156 (Wang et al., 2009), por lo que integra señales procedentes de las diversas rutas que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis* (Yu et al., 2002; Li et al., 2008; Wang et al., 2009a).

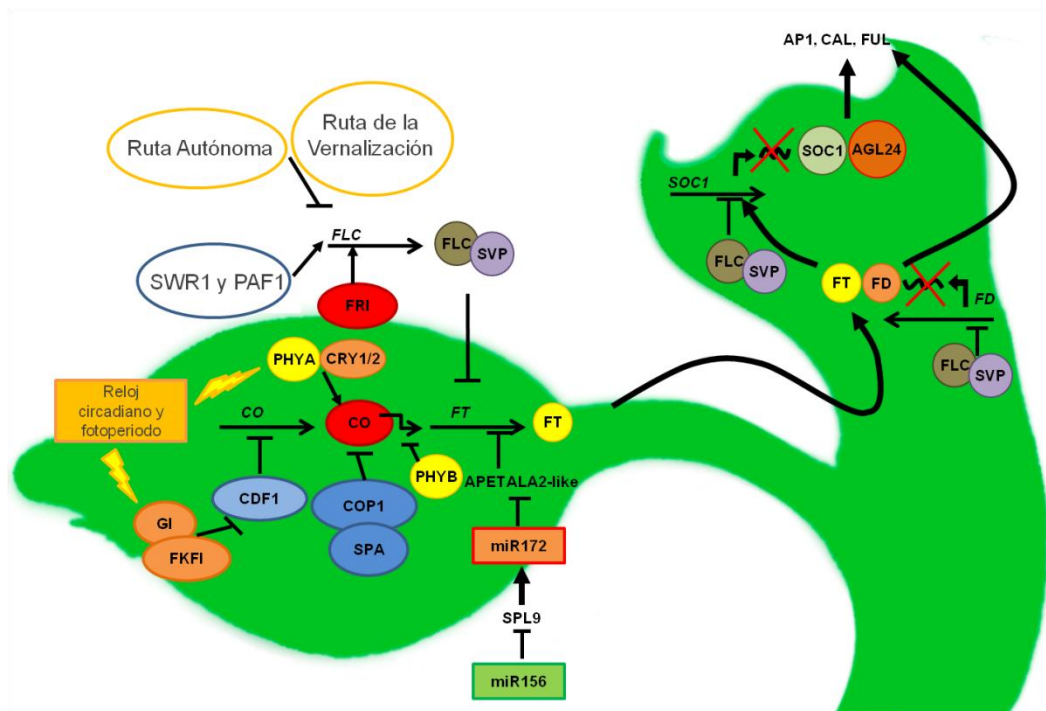


Fig.2. Integración de las señales que controlan la floración en *Arabidopsis thaliana*. Adaptado de Amasino, 2010.

Además de las rutas genéticas de inducción de la floración, otro aspecto central de la regulación de la transición floral es el papel funcional que desempeñan los represores de la transición floral y como estos interactúan con las rutas de inducción de la floración asegurando que la transición floral tenga lugar en el momento adecuado (Sung et al. 2003; Pouteau et al. 2004; Pouteau et al., 2008). Mediante el aislamiento de mutantes de floración temprana, se han identificado genes que juegan un papel represor en el control del tiempo de floración. Muchos de estos mutantes tempranos presentan un alto grado de pleiotropía, que bien son consecuencia de la existencia de distintos procesos generales de regulación génica

que convergen sobre dianas claves de la transición floral (Pouteau et al. 2004), o revelan la posible existencia de reguladores que afecten al control de distintos procesos de desarrollo, además del tiempo de floración. Algunos de estos mutantes con fenotipo de floración temprana, están afectados en factores relacionados con la replicación del DNA, y también presentan alteraciones en procesos de silenciamiento transcripcional (Elmayan et al., 2005; Kapoor et al., 2005a; Kapoor et al., 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 α 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 (ϵ) y también está implicado en la represión de la floración (del Olmo et al., 2010). Otros represores actúan mediando la degradación de las proteínas diana vía el proteasoma 26S, como en el caso de la degradación de CO mediada por COP1 y las proteínas SPA (Saijo et al., 2003; Laubinger et al., 2006; Jang et al., 2008) (sección 1.1). Otro represor implicado en floración es *EARLY IN SHORT DAYS4 (ESD4)*. ESD4 es una proteasa que participa en la ruta de SUMO y el fenotipo temprano de *esd4* en condiciones de DC se asocia con una baja expresión de *FLC* (Reeves et al., 2002; Murtas et al., 2003), y los análisis genéticos han revelado que *ESD4* funciona tanto aguas abajo como de forma paralela a *FLD* (Reeves et al., 2002).

Finalmente también se han descrito un gran número de represores florales que actúan a través de mecanismos de remodelación de la cromatina. Dada la relevancia que en los últimos años han adquirido estos procesos en el control de la transición floral en *Arabidopsis*, discutiremos estos represores florales en una sección independiente en la que tratamos el papel que desempeña la dinámica estructural de la cromatina en el control de la transición floral.

3. Papel de la remodelación de la cromatina en la floración.

Los procesos de remodelación de la cromatina desempeñan un papel central en el establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión génica que dirigen el desarrollo de las plantas. Además, la organización de la cromatina proporciona un mecanismo que asegura la estabilidad de los patrones de expresión a lo largo de las divisiones mitóticas que tienen lugar en una línea celular (Jarillo et al., 2009). Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que la dinámica estructural de la cromatina 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). Una vez que se induce el inicio de la floración por

señales ambientales como el fotoperiodo o la vernalización, el estado reproductivo se mantiene incluso en ausencia de dichas señales, lo que sugiere la existencia de “una memoria molecular de la floración” (Adrian et al., 2010). Esta memoria está mediada por mecanismos epigenéticos que conducen a la represión estable de *FLC* por la vernalización (Sung y Amasino, 2004; Sung et al., 2006; Greb et al 2007; de Lucía et al., 2008) pero también median la regulación de la expresión de los integradores florales (Zhang et al., 2007a; Farrona et al., 2008; Jiang et al., 2008; Oh et al., 2008; Jeong et al., 2009; Adrian et al., 2010).

La unidad básica de la cromatina en las células eucarióticas es el nucleosoma, que está compuesto de un octámero de histonas (dos dímeros H2A-H2B y un tetrámero H3-H4) y aproximadamente 140 pb de DNA, que se enrollan alrededor de las histonas (Luger et al., 1997). Las cadenas de nucleosomas pueden dar lugar a fibras con niveles de compactación mayor, lo que facilita el empaquetamiento del DNA en el núcleo. Diversas proteínas están implicadas en modular la organización de la cromatina, controlando su accesibilidad a factores de transcripción y determinando el estado transcripcional en el que se encuentran regiones discretas del DNA en el genoma. Entre estas proteínas se encuentran chaperonas de histonas, enzimas de remodelación de cromatina dependientes de ATP y enzimas que modifican covalentemente las histonas o el DNA (Jarillo et al., 2009). Las chaperonas de histonas impiden la agregación y el plegamiento inadecuado de las histonas, facilitando su interacción con el DNA y con otras proteínas (Loyola y Almouzni, 2004; Ramírez-Parra y Gutierrez, 2007). A menudo las chaperonas de histonas están asociadas con otros complejos remodeladores de cromatina y con la maquinaria de replicación, y participan en la reorganización de la cromatina y el depósito de nucleosomas (Jarillo et al., 2009). Por otro lado, los enzimas remodeladores de cromatina, cuya actividad depende de la hidrólisis de ATP, modulan las interacciones entre el DNA y el octámero de histonas, desestabilizando la estructura nucleosómica para facilitar el acceso de la maquinaria transcripcional al DNA (Smith y Peterson, 2005; Kwon y Wagner, 2007; van Vugt et al., 2007). En ocasiones, la reorganización de la cromatina dependiente de ATP implica el intercambio de variantes histónicas (Krogan et al., 2003; Mizoguchi et al., 2004; Cai et al., 2005).

El DNA y las histonas pueden ser modificados covalentemente, y estas alteraciones tienen profundas consecuencias sobre la expresión de los genes subyacentes (Vaillant y Paszkowski, 2007). La metilación del DNA ha sido clásicamente asociada al silenciamiento transcripcional, y tanto la heterocromatina en organismos animales como los transposones están fuertemente metilados (Ringrose y Paro, 2007). Los extremos aminoterminales de las histonas pueden sufrir un amplio espectro de modificaciones covalentes tales como

acetilación, metilación, fosforilación o ubiquitinación de residuos específicos. La combinación de modificaciones de histonas presentes en un locus se ha denominado el “código de histonas”, que se asocia a un estado transcripcional determinado (Kouzarides, 2007). Así, la hiperacetilación de histonas se ha asociado con un estado de cromatina activa en transcripción, mientras que niveles bajos de acetilación se correlacionan con el silenciamiento transcripcional (Carroza et al., 2003). Asimismo, la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) y la H3K36me3 se consideran marcas de genes activos (Rando, 2007; Xu et al., 2008), mientras que H3K9me3 y H3K27me3 se encuentran en regiones de cromatina silenciada (Ringrose y Paro, 2007). Se ha propuesto que estas marcas inactivas probablemente recluten otros complejos represores que propagan el estado silenciado a través de sucesivas rondas de replicación (Pien y Grossniklaus, 2007). La presencia de estas modificaciones en las histonas no es suficiente para provocar cambios en los niveles de expresión génica, sino que también es necesario el concurso de proteínas efectoras que son capaces de reconocer específicamente dichas modificaciones y reclutar otros complejos para traducir el código de histonas de una región discreta de cromatina en patrones de expresión génica. Desvelar el papel de estas proteínas efectoras será esencial para comprender como los mecanismos de modulación de la estructura de la cromatina controlan el desarrollo en plantas.

En *Arabidopsis* se han identificado un gran número de proteínas implicadas en distintas actividades relacionadas con procesos de reorganización de la cromatina (Farrona et al., 2008; Jarillo et al., 2009). En esta sección se discuten aquellas que tienen un impacto sobre la regulación del tiempo de floración.

3.1 Control epigenético del represor floral *FLC*, un modelo de regulación de la expresión génica en plantas.

Como hemos discutido anteriormente, el requerimiento de vernalización en accesiones de *Arabidopsis* viene determinado por la capacidad de estas plantas para expresar niveles altos del represor floral *FLC*, que impiden la transición hacia desarrollo reproductivo. La exposición prolongada al frío provoca la represión de *FLC*, que permanece en ese estado silenciado durante el resto del ciclo de vida de la planta, permitiendo el inicio de la floración (Kim et al., 2009). Numerosos estudios realizados en diversos laboratorios durante los últimos años han desvelado el papel esencial que desempeñan los procesos de remodelación de cromatina en la regulación de la expresión de *FLC* y en su represión estable en respuesta a periodos prolongados de frío (Sung y Amasino., 2006; Dennis y Peacock, 2007; Schmitz y Amasino, 2007; Jarillo et al., 2009; Kim et al., 2009).

3.1.1 Activación de *FLC*.

En *Arabidopsis*, el aislamiento de mutantes de floración temprana en variedades de invierno con altos niveles de *FLC* ha permitido identificar genes necesarios para la expresión de este represor floral en los estadios iniciales del desarrollo. Entre ellos se encuentran genes que codifican componentes homólogos a los del complejo RNA Polymerase II Associated Factor 1 (PAF1) de *Saccharomyces cerevisiae*. En levaduras el complejo PAF1 se asocia con la RNA polimerasa II (Betz et al., 2002) y recluta a la metiltransferasa Set 1 del complejo COMPASS (por Complex Proteins Associated with Set 1) a la cromatina de los genes diana, transfiriendo grupos metilo a la H3K4 en la zona 5' de los genes y promoviendo su transcripción (Ng et al., 2003; Shukla et al., 2006). Los homólogos de los componentes del complejo PAF1 identificados en *Arabidopsis* incluyen a EARLY FLOWERING 7 (ELF 7; homólogo de Paf1 de levaduras), EARLY FLOWERING 8 (ELF8)/ VERNALIZATION INDEPENDENT 6 (VIP6; homólogo de Ctr9 de levaduras), VERNALIZATION INDEPENDENCE 3 (VIP3; homólogo de hski8 de humanos), VERNALIZATION INDEPENDENT 4 (VIP 4; homólogo de Leo 1 de levaduras), VERNALIZATION INDEPENDENT 5 (VIP 5; homólogo de Rtf 1 de levaduras) y *AtCDC73* (también llamado *PHP*)(homólogo de Parafibromin/Cdc73 de humanos) (Zhang y van Nocker, 2002; Zhang et al., 2003; He et al., 2004; Oh et al., 2004; Park et al., 2010). En *Arabidopsis*, el complejo PAF 1 se requiere para el enriquecimiento de H3K4me3 en el extremo 5' de *FLC* y H3K36me2/3 a lo largo de todo el locus, favoreciendo su activación transcripcional y por lo tanto, la represión de la transición floral (He et al., 2004; Oh et al., 2008; Crevillén y Dean, 2010).

En *Arabidopsis* también se han identificado al menos 6 genes homólogos de la metiltransferasa Set 1 de levaduras, denominados ATX1-6, que codifican miembros de esta familia (ATX por ARABIDOPSIS TRITHORAX) (Baumbusch et al., 2001; Alvarez-Venegas et al., 2003). Se ha demostrado que ATX1 se une directamente a la cromatina de *FLC*, y que los mutantes *atx1* tienen niveles bajos de H3K4me3 en determinadas regiones de la cromatina de *FLC* y por lo tanto una reducción de la expresión del mismo (Pien et al., 2008). Se ha propuesto que el complejo PAF1 podría reclutar a ATX1 y ATX2 hacia la cromatina de *FLC* (He et al., 2009).

Otro homólogo de Set 1 en *Arabidopsis* es ATXR7/SDG25 (Berr et al., 2009; Tamada et al., 2009); al igual que los mutantes *atx1*, las plantas *atxr7*, florecen antes que la cepa silvestre debido a una reducción de los niveles de expresión de *FLC* y de sus genes homólogos *FLM/MAF1*, *MAF4* y *MAF5*, por lo que la activación de la expresión de los mismos podría estar asociada con la trimetilación de K4H3 mediada por ATXR7 en dichos genes (Amasino et al., 2009). Recientemente se ha demostrado que las marcas H3K4me1 y H3K27me3 son

mutuamente excluyentes (Zhang et al., 2007, 2009) y se postula que la monometilación de H3K4 llevada a cabo por ATX1 y ATXR7 podría ser decisiva para la supresión de H3K27me3 en *FLC* en fondo genético *FRI*-Col (Tamada et al., 2009). Parece que el complejo PAF1 sería también el responsable del reclutamiento de la proteína ATXR7, ya que el doble mutante *elf7 atxr7* tiene un fenotipo indistinguible del fenotipo del mutante sencillo *elf7*, indicando que ambos loci estarían interviniendo en la misma ruta genética (Amasino et al., 2009).

También se ha identificado en *Arabidopsis* un homólogo de la metiltransferasa Set 2 que en levaduras trimetila la H3K36 (Qian y Zhou, 2006), denominada EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (EFS)/SDG8, que aunque clásicamente se había asociado con la dimetilación en la lisina 36 de la H3 (Zao et al., 2005; Xu et al., 2008), recientemente se ha demostrado que posee una doble actividad sobre la activación de *FLC*; por un lado recluta un complejo activador que contiene a *FRI* y por otro actúa como un enzima metiltransferasa tanto de H3K4 como de H3K36 en la cromatina de dicho locus (Ko et al., 2010). *FLC* está también regulado por la proteína WDR5a, homóloga a WDR5 de humanos que es un componente del complejo COMPASS/MLL (Shilatifard, 2008). La proteína responsable del reclutamiento de WDR5a a la cromatina de *FLC* es *FRI* y WDR5a interacciona directamente con ATX1 (Jiang et al., 2009). Parece que los niveles de H3K4me3 depositados por EFS en la cromatina de *FLC* en líneas con un alelo activo de *FRI*, podrían depender de las proteínas ATX1/ATX2 reclutadas por un complejo WDR5a/*FRI*/EFS o bien por EFS directamente (Ko et al., 2010).

Mutantes de *Arabidopsis* afectados en los mecanismos de ubiquitinación y desubiquitinación de la histona H2B también provocan un fenotipo de floración temprana debido a defectos en la activación de *FLC* (Cao et al., 2008; Gu et al., 2009; Xu et al., 2009). En levaduras, la monoubiquitinación de H2B (H2Bub1) requiere la actividad del complejo ubiquitina ligasa RAD6-BRE1; PAF1 es necesario para la monoubiquitinación de H2B dependiente de BRE1, y a su vez H2Bub1 es necesaria para la acumulación de H3K4me3 (Wood et al., 2003). En *Arabidopsis* existen dos genes que codifican homólogos de la E3 ubiquitina ligasa BRE1, *HISTONE MONOUBIQUITINATION 1 (HUB1)* y *HUB2*, y tres para homólogos de la proteína E2 RAD6, *UBIQUITIN CARRIER PROTEIN 1-3 (UBC1-3)* (Cao et al., 2008; Gu et al., 2009; Xu et al., 2009). Las mutaciones que afectan a cualquiera de los genes *HUB* así como los dobles mutantes *ubc1 ubc2* provocan pérdida de H2Bub1 y reducción en los niveles de H3K4me3 y H3K36me3, así como fenotipo de floración temprana que se ha asociado a niveles bajos de expresión de *FLC* (Cao et al., 2008; Gu et al., 2009; Xu et al., 2009). Análisis bioquímicos han demostrado que HUB1 y HUB2 interaccionan entre sí y con el complejo formado por UBC1 y UBC2 (Cao et al., 2008; Gu et al., 2009; Xu et al., 2009), lo que indica que la función de este

complejo en el control del tiempo de floración es la de ubiquitinar la histona H2B en la cromatina de *FLC* y activar su expresión. Asimismo, la pérdida de función del gen *UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 26 (UBP26)*, que codifica una histona H2B deubiquitinasa, provoca un fenotipo de floración temprana asociada también a la presencia de menores niveles de expresión de *FLC* (Schmitz et al., 2009). El mutante *ubp26* acumula en la región genómica de *FLC* niveles elevados de histona H2B monoubiquitinada, de histona H3K27me3 y menores niveles de H3K36me3 (Schmitz et al., 2009). Por lo tanto, la función de UBP26 estaría de acuerdo con un modelo en el cual la deubiquitinación sería necesaria para que se produzca una acumulación suficiente de H3K36me3 que permita una adecuada activación transcripcional del locus *FLC*.

Todos estos datos son consistentes con un modelo en el cual la monoubiquitinación de H2B sería el paso previo a la H3K4me3 en la cromatina de *FLC* mediada por el complejo Paf1/ATX1 y la deubiquitinación de H2B mediada por UBP26 a su vez se requeriría para la acumulación de H3K36me3 mediada por EFS (Schmitz et al., 2009).

Niveles elevados de *FLC* en los estadios iniciales del desarrollo de *Arabidopsis* también dependen de la actividad del complejo SWR1. En levaduras y humanos los complejos SWR1c y SRCAP respectivamente, están implicados en la regulación de la expresión génica a través del intercambio de la histona H2A por la variante H2A.Z (Kobor et al., 2004). En *Arabidopsis* se han identificado diversos homólogos de este complejo, como PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1; homólogo de Swi1 de levaduras, perteneciente a la subfamilia SWI2/SNF2 y subunidad catalítica del complejo) (Noh y Amasino, 2003), ACTIN-RELATED PROTEIN 4 (ARP4) (Kandasamy et al., 2005), SUPPRESSOR OF FRIGIDA 3 (SUF3)/ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (ARP6)/EARLY IN SHORT DAYS 1 (ESD1) (Choi et al., 2007; Deal et al., 2005; Martín-Trillo et al., 2006) y SWC6/SEF (Choi et al., 2007; Lázaro et al., 2008; March-Díaz et al., 2007). Los mutantes afectados en los genes que codifican todas estas proteínas muestran niveles reducidos de *FLC* y una aceleración de la floración (Deal et al., 2007). Además de la existencia de estas proteínas, diversos datos sugieren la existencia de un complejo SWR1 en *Arabidopsis* implicado en el control de la transición floral. Se ha encontrado la variante H2A.Z en la cromatina de *FLC* y se ha observado que en mutantes que afectan a componentes del complejo SWR1, los niveles de dicha variante histónica en la región de *FLC* son menores (Deal et al., 2007). Además, la histona H2A.Z interacciona con PIE1 y plantas con niveles reducidos de expresión de los genes que codifican H2A.Z en *Arabidopsis* muestran un fenotipo similar al de los mutantes del complejo PAF1 (Choi et al., 2007). Por todo ello se ha postulado que el complejo SWR1c de *Arabidopsis*

(AtSwr1c) depositaría la variante histónica H2A.Z en la cromatina del locus *FLC*, cuya presencia es necesaria para la activación de este represor floral (Choi et al., 2007; Deal et al., 2007).

3.1.2 Represión de *FLC* mediada por la exposición al frío.

Como se comentó en el apartado 1.2 la vernalización se define como el mecanismo por el cual la planta adquiere la competencia para florecer al ser expuesta a bajas temperaturas durante períodos de tiempo prolongados (Kim et al., 2009). En *Arabidopsis*, la naturaleza epigenética de la vernalización se debe a una serie de modificaciones en la cromatina de *FLC* que reprimen su expresión. Concretamente los niveles de dos modificaciones represivas H3K9me3 y H3K27me3 se incrementan en la cromatina de *FLC* durante y tras la exposición al frío (Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004).

La metilación de la lisina 27 en la cola de la histona H3 constituye una marca epigenética de cromatina inactiva en transcripción (Farrona et al., 2008). Estudios recientes en *Arabidopsis* han identificado un gran número de genes marcados con H3K27me3 (Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007). La marca H3K27me3 es depositada por el complejo PRC2 por lo que esta modificación está funcionalmente ligada a las proteínas del grupo Polycomb (PcG). PRC2 fue identificado en *Drosophila* (Schwartz y Pirrota, 2007), y está formado por una proteína con actividad metiltransferasa de histonas denominada *Enhancer of Zeste (E(z))*, por *Suppressor of zeste (S(z)12)*, la proteína *W-40 Extra sex combs (ESC)* y por la proteína *Multicopy suppressor of Ira (MSI)*. La marca H3K27me3 es reconocida por PRC1 en animales, un complejo multiproteico necesario para la represión transcripcional (Farrona et al., 2008).

En *Arabidopsis*, *MEDEA (MEA)* (Grossniklaus et al., 1998), *CURLY LEAF (CLF)* (Goodrich et al., 1997), y *SWINGER (SWN)* codifican homólogos de E(Z) (Luo et al., 2000; Chanvivattana et al., 2004). Los niveles de H3K27me3 se encuentran reducidos en los mutantes *clf* y en los dobles mutantes *clf swn*, lo que sugiere la conservación de los complejos PRC2 en animales y plantas (Makarevich et al., 2006; Schubert et al., 2006). Tres genes codifican para homólogos de SU(Z)12, *FERTILIZATION INDEPENDENT SEED 2 (FIS2)* (Luo et al., 2000), *EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2)* (Yang et al., 1995; Yoshida et al., 2001) y *VRN2* (Chandler et al., 1996). *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* es el único gen en *Arabidopsis* que codifica para un homólogo de ESC (Ohad et al., 1999). CLF, SWN y FIE forman parte de varios complejos PRC2 y participan de una forma general en la regulación del desarrollo de *Arabidopsis* (Kohler y Grossniklaus, 2002; Chanvivattana et al., 2004; Wood et al., 2006). Las diversas proteínas de tipo SU(Z)12 tienen funciones más específicas en *Arabidopsis*, y de hecho los complejos PRC2

de los que forman parte se denominan en función de estas subunidades como complejo VRN2, complejo EMF2 y complejo FIS2 (Chanvivattana et al., 2004; Kohler y Grossniklaus, 2002; Wood et al., 2006). En *Arabidopsis* hay cinco proteínas MSI-like y dos de ellas, MSI 1 y MSI 4/FVE, se han implicado en floración (Kohler et al., 2003; Ausín et al., 2004).

VRN2 forma parte de un complejo proteico del tipo PRC2 en el que se encuentran también las proteínas FIE, CLF y SWN (Bastow et al., 2004). El complejo VRN2-PRC2 es responsable de la metilación de H3K27 que se observa en la cromatina de *FLC* tras la exposición prolongada al frío, y de hecho, esta modificación está ausente en los mutantes *vrn2*, que son incapaces de mantener establemente la represión de *FLC* (Gendall et al., 2001). Además de la metilación de H3K27, otras marcas epigenéticas también son esenciales para la respuesta de vernalización. Entre ellas se encuentra la marca H3K9me3, igualmente asociada a cromatina en estado silencioso (Kim et al., 2009); los mutantes *vrn1*, afectados en un gen que codifica una proteína de unión a DNA, carecen de esta modificación pero no de H3K27me3, y tampoco mantienen la represión de *FLC* de forma estable (Sung et al., 2006). VIN3, una proteína que contiene un dominio PHD (Plant Homeodomain) normalmente presente en remodeladores de cromatina, también es necesaria para acelerar la floración en respuesta a bajas temperaturas, y es responsable de la represión inicial de *FLC* (Sung y Amasino, 2004a). La expresión de *VIN3* sólo se induce después de una exposición prolongada a frío, proporcionando un mecanismo molecular para asegurar que las plantas sólo respondan a una estación de invierno completa y no a periodos cortos de frío (Bienz, 2006; Sung y Amasino, 2006). En el mutante *vin3* no se produce ninguna de las modificaciones de las histonas características de la vernalización, lo que sugiere que *VIN3* es crucial para el establecimiento de una conformación inactiva de la cromatina en el locus *FLC* tras la exposición prolongada al frío (Sung y Amasino, 2004). Se ha propuesto que *VIN3* es necesario en los primeros estadios de la respuesta de *Arabidopsis* a vernalización, que implica la deacetilación del locus *FLC* tras la exposición a las bajas temperaturas (Sung y Amasino, 2004). Recientemente se ha identificado a *VIN3* en el complejo VRN2-PRC2, por lo que podría existir un mecanismo coordinado para reclutar diversas actividades remodeladoras de cromatina al locus *FLC* en respuesta al frío; no está claro sin embargo si *VIN3* es parte integrante de ese complejo o si ambos se unen de manera secuencial a las regiones reguladoras de *FLC* (Dennis et al., 2006). Por ensayos de doble híbrido se han identificado proteínas que interactúan con *VIN3*, como *VIN3-LIKE protein LIKE 1 (VIL1)/VRN5*. Al igual que sucede en los mutantes *vin3*, los mutantes *vil1/vrn5* tienen insensibilidad a la vernalización y no acumulan en la cromatina de *FLC* las marcas represivas correspondientes (de Lucía et al., 2008). Aunque la secuencia de acontecimientos

que conducen a la represión de *FLC* no está clara, se ha postulado que la respuesta a vernalización dependería de la asociación de un complejo formado por VIN3 y VRN5/VIL1 que, tras el retorno de la planta a temperaturas normales de crecimiento se distribuye a lo largo del locus *FLC* (De Lucía et al., 2008). En cualquier caso, todos estos estudios han confirmado que diversos complejos implicados en procesos relacionados con la reorganización de la cromatina del locus *FLC* son esenciales para la respuesta de vernalización (He et al., 2009).

El complejo PRC2-VRN2 es el responsable del establecimiento de la represión de *FLC* tras la vernalización, pero no del mantenimiento de dicha represión (Sheldon et al., 2006). En *Arabidopsis*, se ha propuesto que este papel lo desempeña la proteína LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1/TERMINAL FLOWERING 2 (LHP1/TFL2), homóloga a la proteína HP1 de humanos, que reconoce a través de su dominio chromodomain la marca epigenética H3K27me3, contribuyendo al mantenimiento del estado silenciado de sus genes diana (Levy et al., 2002; Mylne et al., 2006; Sung et al., 2006a; Turk et al., 2007).

El mutante *tfl2/lhp1* tiene un fenotipo muy pleiotrópico, con alteraciones en el tiempo de floración, en la arquitectura de la planta, la morfología de la hoja, la determinación de la inflorescencia y en determinados niveles hormonales (Larsson et al., 1998; Gaudin et al., 2001; Kotake et al., 2003). Sin embargo, los alelos nulos de *tfl2/lhp1* presentan alteraciones fenotípicas menos extremas que alelos fuertes de genes que codifican otras subunidades del complejo PRC2, indicando que otras proteínas podrían estar actuando de forma redundante con TFL2/LHP1.

También se ha descrito una ruta de respuesta a vernalización que actuaría de forma independiente de *FLC* (Schönrock et al., 2006). Esta ruta estaría mediada por el gen *AGAMOUS LIKE 19 (AGL19)* que codifica un factor de transcripción de tipo MADS-box (Alexander y Hennig, 2008). *AGL19* tiene un papel independiente de *FLC*, puesto que el doble mutante *flc agl19* tiene un fenotipo aditivo en su respuesta a la vernalización (Schönrock et al., 2006). Al contrario de lo que ocurre con *FLC*, que se mantiene silenciado tras la vernalización, la expresión de *AGL19* se silencia temporalmente antes de la vernalización y posteriormente se induce durante la exposición a frío. En el caso de *FLC*, este silenciamiento se debe tanto a la presencia de la marca H3K27me3 como de H3K9me3 (Bastow et al., 2004; Sung y Amasino, 2004). Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina han demostrado que la marca H3K27me3 está presente en la cromatina de *AGL19* antes del tratamiento de vernalización (Schönrock et al., 2006), sin embargo, en *AGL19* no se detecta la marca H3K9me3 (Fuchs et al., 2006). La deposición de la marca H3K27me3 en *AGL19* es dependiente de un complejo PRC2

formado por EMF2, CLF/SWN, FIE y MSI1 (Schönrock et al., 2006) y al igual que en el caso de *FLC*, VIN3 también participa en la regulación de *AGL19*. En la cromatina de *FLC*, VIN3 podría estar implicado en el reclutamiento del complejo VRN2. En el caso de *AGL19* se ha propuesto que VIN3 podría mediar la separación del complejo PRC2-EMF2 del locus *AGL19* (Alexander y Henning, 2008).

3.1.3 Otros represores de *FLC*.

Otros complejos remodeladores de cromatina están implicados en la represión de *FLC*, aunque su actividad no es dependiente de la exposición prolongada al frío, y de hecho, los genes que codifican estas proteínas se han incluido en la ruta autónoma de inducción de la floración. Algunas de estas proteínas forman parte de complejos con actividad demetilasa de histonas. La metilación de histonas se consideraba irreversible hasta el descubrimiento reciente de una serie de enzimas capaces de demetilar residuos específicos de las histonas (Cloos et al., 2008). Así, la demetilasa de lisina 1 de mamíferos (LSD1), también denominada demetilasa-K (KDM1), es una monoamina oxidasa dependiente de FAD que se caracteriza por la presencia de un dominio SWIRM. LSD1 forma parte de diversos complejos implicados tanto en activación como en represión transcripcional, a través de la demetilación de H3K4me2/me1 y de H3K9me2/me1 respectivamente (Shi et al., 2004; Metzger et al., 2005; Cloos et al., 2008; Forneris et al., 2008; Lan et al., 2008). En metazoos, LSD1 está codificada por un gen de copia única, mientras que en *Arabidopsis* hay cuatro homólogos, de los cuales al menos tres, *FLD*, *LSD1-LIKE1/SWIRM DOMAIN PAO PROTEIN1 (LDL1/SWP1)* y *LSD1-LIKE2 (LDL2)*, están implicados en floración (He et al., 2003; Jiang et al., 2007). Los mutantes *fld* muestran un retraso en floración debido a un aumento en la expresión de *FLC* (He et al., 2003). Los mutantes *ldl1* presentan un fenotipo de floración tardía en DL, y la mutación *ldl2* potencia el fenotipo de *ldl1*. En los dobles mutantes *ldl1 ldl2* se observa un aumento de la expresión de *FLC*, aunque el retraso de la floración observado en estas plantas no es completamente dependiente de este represor floral (He et al., 2003; Jiang et al., 2007); de hecho en los dobles mutantes *ldl1 ldl2* y *ldl1 fld* se detecta un aumento de las marcas H3K4m3/2 en la región 5' de la cromatina de *FLC* (Jiang et al., 2007; Cloos et al., 2008; Forneris et al., 2008). Además en ausencia de *FLD*, se detecta un aumento en los niveles de acetilación en el promotor de *FLC*, lo que sugiere que tal y como sucede en animales, FLD se asocia con un complejo HDAC (He et al., 2003; Shi et al., 2005; Lee et al., 2006; Cloos et al., 2008). Sin embargo, aún no se ha demostrado experimentalmente la actividad demetilasa de las proteínas FLD/LDL de

Arabidopsis, por lo que es posible que necesiten cofactores presentes en los complejos de los que forman parte para llevar a cabo esta función (Jiang et al., 2007).

Otro gen implicado en la represión de *FLC* es *FVE* que codifica la proteína AtMSI4 de unión al retinoblastoma (RbAp) (Ausín et al., 2004). En levaduras y animales las proteínas del retinoblastoma funcionan como represores transcripcionales reclutando histonas deacetilasas (HDAC) de tipo HD1/RPD3 (Henning et al., 2005). En los mutantes *fve* se observa un incremento en los niveles de acetilación de *FLC* por lo que se postula que *FVE* podría participar en la represión de este locus modificando su estado de acetilación (Ausín et al., 2004).

Por otro lado, la proteína demetilasa de histonas de tipo Jumonji C (Jmj C) REF6, actúa demetilando H3K4me2/me3 en la región 5' de *FLC* y H3K36me2 en la zona interna del gen, a las que se asocia directamente. (Ko et al., 2010). Los mutantes *ref6* tienen un fenotipo de floración tardía tanto en DL como en DC debido a la sobreexpresión de *FLC* (Noh et al., 2004). Los altos niveles de expresión de *FLC* observados en los mutantes *ref6* se han relacionado también, con un incremento en los niveles de acetilación de la histona H4, aunque esto podría ser un efecto secundario, ya que no existen evidencias del papel directo de REF6 en acetilación de histonas. Además líneas transgénicas que sobreexpresan *REF6* también tienen niveles de expresión elevados de los integradores florales *FT* y *SOC1*, independientemente de *FLC*, por lo que parece probable que *REF6* participe en diferentes rutas de floración (Noh et al., 2004).

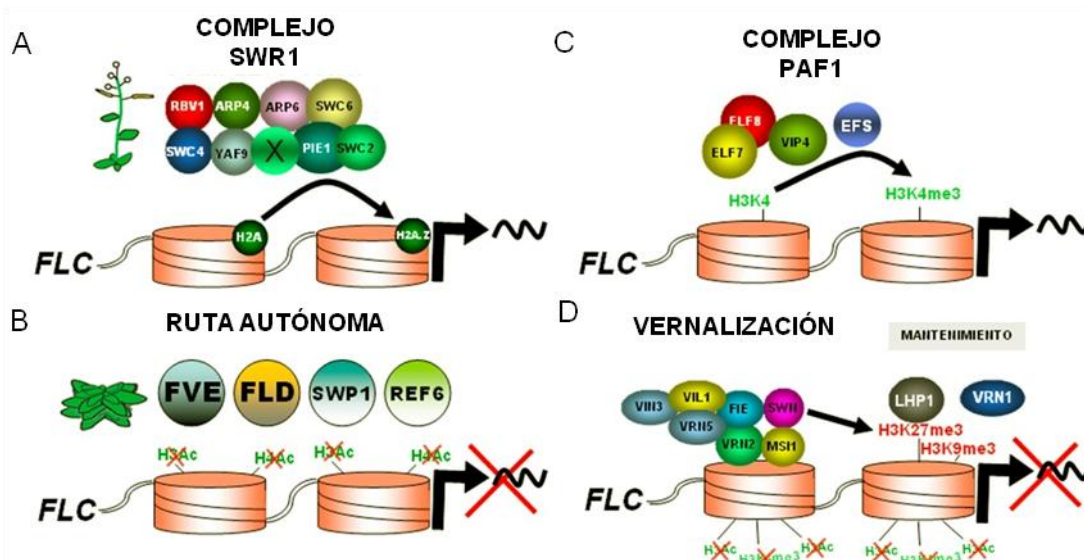


Fig.3. Regulación epigenética del represor floral *FLC*. A. Activación de la expresión de *FLC* mediada por el complejo SWIR1. B. Represión de *FLC* por parte de los genes de la ruta autónoma. C. Activación de la expresión de *FLC* mediada por el complejo PAF1. D. Represión de *FLC* tras la vernalización.

3.2 Remodelación de la cromatina en la regulación de otros genes de tiempo de floración.

Aunque *FLC* se ha convertido en un modelo de regulación epigenética de la expresión génica, no es el único locus implicado en el control de la transición floral cuya expresión está regulada por procesos de reorganización de la cromatina. Así, se han identificado modificaciones covalentes de las histonas que son importantes para la regulación transcripcional del integrador floral *SOC1* y que son dependientes de la actividad de la proteína MSI1. Esta proteína participa en complejos de tipo PRC2 como represor transcripcional (revisado en Henning et al., 2005), y también pueden estar implicada en complejos activadores de la transcripción como el complejo de *Drosophila* Nucleosome Remodelling Factor NURF (Mizuguchi et al., 1997; Martínez-Balbas et al., 1998). MSI1 es necesaria para modular los niveles de H3K4me2 y H3K9Ac en determinadas regiones del locus *SOC1*, y además, dichos niveles correlacionan con la transcripción de este integrador floral (Bouvaret et al., 2006). Estas observaciones indican que procesos de remodelación de la cromatina participan en la regulación transcripcional de *SOC1*.

Las plantas con expresión reducida del gen *BRAHMA (BRM)* florecen antes tanto en fotoperiodos inductivos como no inductivos de la floración, mientras que los mutantes *brm* florecen con menos hojas, aunque más tarde que el ecotipo silvestre tanto en DL como en DC (Wagner y Meyerowitz, 2002; Farrona et al., 2004; Bezhani et al., 2007). El fenotipo de floración de las plantas con expresión reducida del gen *BRM* está relacionado con niveles altos de expresión de los genes *CO*, *FT* y *SOC1*, mientras que los mutantes *brm* presentan expresión ectópica de varios genes implicados en el desarrollo floral (Farrona et al., 2004; Hurtado et al., 2006; Farrona et al., 2007). BRM forma parte de complejos remodeladores de cromatina dependientes de la hidrólisis de ATP que alteran las interacciones entre las histonas y el DNA y permiten una conformación más fluida de la cromatina, facilitando la accesibilidad al DNA (Farrona et al., 2010). Todos los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP purificados, tienen en común la presencia de una proteína con actividad ATPasa/Helicasa de la familia SWITCH2/SUCROSE NONFERMENTING 2 (SWI2/SNF2) que actúa como subunidad catalítica. Más de 40 proteínas de la familia SWI2/SNF2 están presentes en *Arabidopsis* y, aunque no todas han sido caracterizadas, diferentes datos genéticos y moleculares han puesto de manifiesto su implicación en la floración (Jerzmanowski, 2007; Kwon y Wagner, 2007; Saha et al., 2006). Otra proteína ATPasa/Helicasa SWI/SNF en *Arabidopsis* es *SPLAYED (SYD)* (Farrona et al., 2004). Los mutantes *syd*, acentúan el fenotipo de los mutantes *lfy-5* y son tempranos en DC (Wagner y Meyerowitz, 2002) y los dobles mutantes *brm syd* tienen un

fenotipo pleiotrópico con algunas características redundantes, lo que sugiere que ambas proteínas tienen tanto funciones compartidas como específicas (Wagner y Meyerowitz, 2002; Farrona et al., 2004; Bezhani et al., 2007).

Además, el extremo amino terminal de AtBRM interacciona, en experimentos de doble híbrido con AtSWI3C, un homólogo de Arabidopsis de la subunidad SWI3 del complejo de levaduras SWI/SNF, lo que sugiere la existencia de conexiones entre diferentes proteínas AtSWI3 y otros componentes de los complejos AtSWI/SNF (Sarnowski et al., 2002; Sarnowski et al., 2005; Hurtado et al., 2006; Bezhani et al., 2007). Las subunidades SWI3 también se han relacionado con la floración (Sarnowski et al., 2005) y en Arabidopsis se han aislado cuatro miembros de esta familia (AtSWI3A-D).

3.3 Control epigenético del integrador floral *FT*.

El complejo PRC2 también está implicado en la represión de otros genes de floración además de *FLC*, tales como el integrador floral *FT* (Jiang et al., 2008). Las proteínas homólogas a las del PcG de Drosophila como CLF, FIE y EMF2 actúan reprimiendo la expresión de *FT* (Pien y Grossniklaus, 2007; Jiang et al., 2008), y se ha demostrado que CLF se une directamente al locus *FT* y media la deposición de la marca H3K27me3 en su cromatina (Jiang et al., 2008). Por su parte TFL2/LHP1, además de mantener la cromatina del locus *FLC* en un estado inactivo tras la vernalización (Sung et al. 2006), también participa en el silenciamiento de otros genes como *FT* (Gaudin et al. 2001; Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007). TFL2/LHP1 se une a la marca H3K27me3 en la cromatina de *FT*, manteniendo estable la represión transcripcional de este locus (Turck et al., 2007; Jiang et al., 2008). *CO* y *LHP1* se expresan de forma contraria en la hoja, de tal forma que la transcripción de *FT* tendría lugar cuando la activación mediada por *CO* superase la represión ejercida por *LHP1* (Adrian et al., 2010). La activación de la expresión de *FT* mediada por *CO* tendría lugar en una región del promotor de *FT* próxima al codón de iniciación de la transcripción del locus, pero requeriría de la interacción con un complejo activador que se asociaría en una región distal del promotor de *FT* (Adrian et al., 2010). Al igual que ocurre en *FLC*, el locus *FT* está cubierto por la marca H3K27me3 y por la proteína *LHP1* (Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007b), aunque se ha comprobado que la región donde se uniría el complejo activador de *CO* coincide con una región de *FT* empobrecida en la marca H3K27me3 y por lo tanto en *LHP1*, estableciéndose un mecanismo de regulación en el que ciertas regiones de la cromatina estarían en un estado abierto y por lo tanto accesible a los reguladores transcripcionales (Adrian et al., 2010).

Las proteínas JmjC *EARLY FLOWERING6 (ELF6)* y *AtJMJ4* también reprimen la expresión de *FT*. Los mutantes *Atjmj4* y *elf6* presentan un fenotipo de floración temprana y tienen aumentada tanto la expresión de *FT* como los niveles de H3K4me3 en la cromatina de este locus. Estas proteínas tienen actividad demetilasa de H3K4me1, 2 y 3 (Jeong et al., 2009) y se ha demostrado que *AtJmj4* y *ELF6* se unen directamente al sitio de inicio de la transcripción de *FT*, y es en esa región genómica donde se observa un incremento en los niveles de la marca H3K4me3 tanto en los mutantes *Atjmj4* como en los mutantes *elf6*. Por lo tanto, se ha propuesto que *AtJmj4* y *ELF6* actúan como demetilasas de la cromatina de *FT* y su función podría ser la de evitar una floración precoz en *Arabidopsis* (Noh et al., 2009).

Otro de los genes implicados en la represión de *FT* en condiciones de DC es *EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS)* (Piñeiro et al., 2003). Los mutantes *ebs* presentan un fenotipo de floración temprana y otras alteraciones en el desarrollo de la planta tales como una reducción en la dormición de las semillas y un aumento de la expresión de genes homeóticos de identidad de meristemo floral. Estas alteraciones fenotípicas sugieren que *EBS* actúa como represor en diversos procesos de desarrollo (Gómez-Mena et al., 2001). La identificación de *EBS* reveló que la proteína codificada por este gen es parte de una familia de reguladores transcripcionales vegetales que se caracteriza por contener un dominio BAH (bromo-adjacent homology) y un dominio PHD (Plant Homeo Domain), lo que sugería que la proteína *EBS* formaría parte de un complejo represor transcripcional implicado en la remodelación de la cromatina (Piñeiro et al., 2003). El análisis genético y molecular de los mutantes *ebs* sugirió que *EBS* participaba en la regulación del tiempo de floración reprimiendo la expresión del integrador floral *FT*, independientemente de otras rutas de regulación del tiempo de floración descritas previamente. Además de *EBS*, existen en *Arabidopsis* otras dos proteínas con la misma disposición de dominios, denominadas *EBS-LIKE 1/SHORT LIFE (EBL1/SHL)* y *EBL2*. *EBL2* es una proteína predicha para la que no existen ESTs en las bases de datos mientras que *SHL* es una proteína nuclear que ha sido implicada en la regulación de procesos del desarrollo en *Arabidopsis* (Müssig et al., 2000; Müssig y Altman, 2003).

La arquitectura funcional de estas proteínas sugiere que estarían implicadas en la regulación de la expresión génica a través de cambios en la estructura de la cromatina. Sin embargo, su función a nivel bioquímico y cual sería su papel en modular la dinámica estructural de la cromatina han permanecido desconocidos hasta el momento.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se enmarcan en nuestro interés por 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. En particular, en el presente trabajo se planteó como objetivo general, la caracterización genética y molecular del locus *SHL*, un posible represor del tiempo de floración en *Arabidopsis*. Los dominios funcionales presentes en la proteína SHL sugieren que estaría implicada en procesos de remodelación de cromatina relacionados con el control de la expresión génica. La función a nivel molecular de esta proteína así como la de otra de la misma familia, con su misma distribución de dominios, y su alto nivel de homología, previamente descrita como EBS, ha permanecido desconocida hasta el momento. Además, esta familia de proteínas está presente exclusivamente en plantas por lo que no ha sido posible inferir su función en base a estudios previos realizados en organismos animales o en levaduras que han facilitado la caracterización de otras proteínas remodeladoras de cromatina identificadas en plantas. Por ello, hemos abordado el análisis bioquímico de estas proteínas, SHL y EBS, con el fin de contribuir a establecer un papel en el control de la transcripción en relación con procesos de reorganización de la cromatina. Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

- Caracterizar funcionalmente el gen *SHL/EBL1* de *Arabidopsis*.
- Determinar la función de *SHL* en la regulación del tiempo de floración y en otros aspectos del desarrollo de *Arabidopsis* mediante el análisis de alelos de pérdida de función.
- Analizar la posible redundancia funcional entre *SHL* y su homólogo *EBS* en el control del tiempo de floración.
- Estudiar la interacción genética entre *SHL* y las rutas inductoras de la floración en *Arabidopsis*, mediante la construcción de dobles mutantes con mutantes representativos de cada una de ellas.
- Analizar el papel de *SHL* en la regulación de la expresión de genes de tiempo de floración.
- Determinar las posibles interacciones de *EBS* y *SHL* con factores implicados en la remodelación de la cromatina.
- Analizar la función bioquímica de EBS y SHL y su papel como remodeladores de la cromatina en la transición floral de *Arabidopsis*, estudiando su contribución a la dinámica estructural de sus genes diana.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal.

En este trabajo se han utilizado las accesiones de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Landsberg *erecta* (Ler) y Columbia (Col). Además, se han usado líneas mutantes obtenidas tanto en los bancos de semillas del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, UK), como las aportadas por los distintos grupos que trabajan en floración (Tabla 1). El mutante *shl-2* corresponde a una línea portadora de un elemento transponible de tipo *Dissociation* (Ds), denominada GT442 (Gene Trap 442), que fue obtenida de la colección de mutantes de inserción de Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL, USA). El mutante *shl-2* se encuentra en un fondo genético Ler. El lugar exacto de la inserción se determinó por secuenciación de un fragmento de PCR generado utilizando los cebadores Ds 5-4 (TCAGATAACGGTTCGGTACGG) y SHL 1 R (TCACTTTCAATATCCACGAATTC). Los cruzamientos de *shl-2* con otros mutantes se han realizado con alelos en el mismo fondo genético o en fondo Col, para lo cual la mutación *shl-2* se introgresó en dicho fondo mediante tres retrocruzamientos sucesivos. El alelo *shl-1* fue obtenido antes de mi incorporación al laboratorio por el Dr. Jarillo (INIA, Madrid) a partir de la colección de líneas de inserción del Dr. Alonso y el Dr. Ecker, empleando para ello cebadores específicos del locus *SHL* (ebl2A: ATGCCCAAGCAAAAAGCTCCAA GGAAGCAG y ebl2B: TATAGCAAGCTAACTTGGGTGAAAGACCCA) y del T-DNA (LB1: TCAGAAATGGATAAATAGCCT TGC). El lugar exacto de las inserciones se determinó por secuenciación de un fragmento de PCR generado utilizando los cebadores ebl2A y LB1 en el caso del alelo *shl-1*. Asimismo, se han empleado líneas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *EBS* (35S::*EBS*) que estaban disponibles en el laboratorio y que han sido descritas previamente (Piñeiro et al., 2003).

Alelo	Locus	Fondo Genético	Referencia	Fenotipo
<i>gi-3</i>	<i>GI</i>	<i>Ler</i>	Koornneef et al., 1991	Tardía en DL
<i>co-2</i>	<i>CO</i>	<i>Ler</i>	Koornneef et al., 1991	Tardía en DL
<i>fve-1</i>	<i>FVE</i>	<i>Ler</i>	Koornneef et al., 1991	Tardía
<i>fca-1</i>	<i>FCA</i>	<i>Ler</i>	Koornneef et al., 1991	Tardía
<i>ga1-3</i>	<i>GA1</i>	<i>Ler</i>	Talon et al., 1990	Tardía en DL, no florece sin GA en DC
<i>ga2-1</i>	<i>GA2</i>	<i>Ler</i>	Koornneef et al., 1980	Tardía
<i>ft-1</i>	<i>FT</i>	<i>Ler</i>	Koornneef et al., 1980	Tardía en DL
<i>soc1-1</i>	<i>SOC1</i>	<i>Ler</i>	Onouchi et al., 2000	Tardía
<i>tfl2-1</i>	<i>TFL2</i>	<i>Col</i>	Larsson et al., 1998	Temprana
<i>ebs-1</i>	<i>EBS</i>	<i>Ler</i>	Gómez-Mena et al., 2001	Temprana
<i>ap1-1</i>	<i>AP1</i>	<i>Ler</i>	Koornneef et al., 1980	Sin fenotipo de floración
<i>clf-16</i>	<i>CLF</i>	<i>Ler</i>		Temprana
<i>lfy-5</i>	<i>LFY</i>	<i>Ler</i>	Weigel et al., 1992	Sin fenotipo de floración

Tabla1. Líneas mutantes cedidas por otros grupos para la realización de este trabajo.

2. Condiciones de cultivo de las plantas.

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en sustrato universal y vermiculita (proporción 3:1), o en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962) para cultivo in vitro. En el caso del cultivo in vitro, las semillas se esterilizaron previamente durante diez minutos en una solución lejía comercial al 60%, Tritón X-100 al 0.1% y se aclararon hasta tres veces con agua estéril. A continuación, las semillas se sembraron en placas Petri con medio MS suplementado con sacarosa al 2% y agar al 0.8%.

Una vez sembradas, las semillas se estratificaron durante tres días a 4°C en oscuridad. Posteriormente, 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 de ~120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cuanto al fotoperíodo, se usaron condiciones de día largo (DL, 16h luz/8h oscuridad) y de día corto (DC, 8h luz/16h oscuridad).

En el caso de la selección de líneas transgénicas el procedimiento fue similar, pero las semillas T1 una vez esterilizadas fueron sembradas a una densidad 50 semillas/ cm^2 , en medio GM sólido suplementado con el antibiótico correspondiente (Kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Una vez

obtenidas las semillas de las generaciones T2, se sembraron en las mismas condiciones 200 semillas de cada generación de forma independiente y las líneas transgénicas se seleccionaron atendiendo a la tasa de supervivencia en medio selectivo. La proporción 3:1 se tomó como indicativa de que las líneas que eran portadoras de una sola inserción de T-DNA.

Para los análisis transcripcionales mediante RT-PCR o Northern blot, las semillas fueron esterilizadas de modo similar al anteriormente descrito y sembradas a una densidad de 25 semillas/cm², en placas Petri con medio MS suplementado con agar al 0,8% (Medio MS sólido). Posteriormente, las semillas fueron estratificadas y cultivadas como se ha descrito anteriormente.

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 (medio MS suplementado con sacarosa al 3%), vitaminas, 0,5 mg/L de NAA (ácido naftalenacético) (disuelto en 0,1N de NaOH) y 0,1 mg/L de kinetina (disuelto en 0,1N de NaOH). Para mantener el cultivo las una fracción de las células se pasan a medio fresco semanalmente, diluyéndolas 1/20 en 50 ml de MSS suplementado.

Posteriormente, el material vegetal fue recogido en N2 (l) para su posterior procesamiento y/o análisis dependiendo del experimento.

3. Análisis fenotípicos.

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 primer 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. Los datos se presentan como la media de los valores obtenidos \pm la desviación estándar. El tamaño de la muestra fue de al menos 20 plantas en condiciones de DC y de entre 30 y 50 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.

Analizamos la duración de las fases de desarrollo vegetativo cuantificando el número de hojas juveniles (hojas pequeñas, redondeadas y con tricomas en su cara adaxial), adultas (hojas ovaladas y con tricomas en ambas caras) y caulinares (hojas del tallo de la inflorescencia que aparecen en la base de las ramas laterales; muestran tricomas únicamente en la cara abaxial). Las semillas se sembraron en sustrato y vermiculita en condiciones de DL o DC. Cuando la altura de la plantas fue de 5 cm, se contaron por separado el número de hojas juveniles, adultas, y caulinares (Telfer et al., 1997). El tamaño de la muestra fue de entre 20 y 30 plantas.

3.3 Medida de caracteres morfológicos.

Las semillas se sembraron en sustrato y vermiculita en condiciones de DL y se midió la longitud del tallo y el diámetro de la roseta. El tamaño de la muestra fue de 15 plantas. Asimismo, se midió el tamaño de las silicuas totalmente formadas con una regla. La muestra está formada por 50 silicuas de cuatro plantas independientes.

4. Análisis genéticos.

4.1 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 un tubo eppendorf conteniendo bolas de vidrio de 1 mm de diámetro, después de haber depositado el tejido y haber congelado su contenido en N₂ (l), los tubos fueron introducidos en un molino agitador (SILAMAT 5s, Schaan, Principality of Liechtenstein) con el fin de que las bolas cizallen y muelan la muestra congelada. Finalmente, el DNA genómico se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Bernatzky y Tanksley (1986).

El DNA genómico empleado en el experimento de Southern blot (Fig. 10), se obtuvo de aproximadamente 15 µg de material vegetal y se extrajo siguiendo el protocolo de Bernatzky y Tanksley (1986).

La determinación de las concentraciones de las soluciones de DNA, se realizó en geles de agarosa al 0,8% en TBE (p/v) mediante la comparación con muestras de DNA de concentración conocida, o bien determinando la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro

(NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA). Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo mediante los métodos usuales (Sambrook et al., 1989) siguiendo en cada caso las recomendaciones específicas de cada fabricante.

Las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa de concentración variable entre 0,8 y 4 % en TBE (p/v), en función del tamaño esperado de los fragmentos a resolver.

Para la detección de fragmentos específicos de DNA mediante hibridaciones tipo Southern, el DNA se transfirió a membranas de nylon Hybond N+ (Amersham-Pharmacia), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Esta transferencia se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Amersham y modificado por Debener y Clarke, durante 14-16 horas. La sonda empleada en el experimento de Southern-blot llevado a cabo para confirmar la presencia de las inserciones en la región genómica de *SHL* (Fig. 10), se obtuvo mediante una reacción de PCR con los cebadores SHL3F: AACCTTCCAAAAAGTAAAATC y SHL3R: CGTACGTATGATTACATTCGAAA.

Los mutantes dobles analizados en este trabajo se obtuvieron mediante el cruzamiento de mutantes simples y posterior selección de la doble mutación en la generación F2 usando marcadores moleculares. Para confirmar que las plantas seleccionadas eran dobles mutantes se comprobó que en la generación F3 no se producía segregación de los parentales. Para el genotipado de los dobles mutantes, se utilizaron marcadores ya publicados (Tabla 2).

Alelo	Tipo	Enzima	Directo	Reverso
<i>fve-1</i>	CAPS	<i>Xmn I</i>	CAACCTACAAGAATCGCCAGC	ATCATGCGCTTTTTCAACCTG
<i>fca-1</i>	CAPS	<i>Mse I</i>	CTCTTCACAGTCCACAGGGTCTG	TGTTGCATCTTTGTAGCGGTT
<i>ga1-3</i>	SSLP		SILV:TTTGCGCCAACACACAAACCTT MUT:TGTATGCACGTTAACGATCAAT	SILV:AAGCTTCGAACTCCAGGTTCTA MUT:TTTCTTCATACCACCTGCGTTC
<i>soc1-1</i>	dCAPS	<i>Taq I</i>	CCGTTTAGAAGCTTCGAGTTGTT	GCCAGCTTTTGATCAGATGTTTC
<i>ft-1</i>	dCAPS	<i>Taq I</i>	AGTTTTCTACAATTGTCAGAGGGAGA GTGGCTTCG	AGGCATCATCACCGTTCGTTACT CGTATC
<i>gi-3</i>	dCAPS	<i>Mnl I</i>	AAAGCAGCAGCAGCAGTTGTCCCT	CAAATGAGTGAACCAAGCATT
<i>co-2</i>	dCAPS	<i>Nsp I</i>	AACGACATAGGTAGTGGAGAGAAC	CGAAGCAACCTCCTTGGC
<i>tfl2-1</i>	dCAPS	<i>Dde I</i>	GTAACGGTGCAGGATGTTCC	CCGCTTAGCACCTATGAAACG

Tabla 2. Marcadores moleculares de alelos mutantes.

5. Obtención de construcciones plasmídicas.

5.1 Análisis del promotor de *EBS* y *SHL* en plantas transgénicas portadoras de las construcciones *EBS::GUS* y *SHL::GUS*.

Los cebadores utilizados para amplificar el promotor de *SHL* (2,3kb) y de *EBS* (1kb) a partir del cDNA de ambos previamente clonado en vectores pGEMT (Promega) y Bluescript II KS (Stratagene) respectivamente fueron los que se muestran en la tabla 3.

Línea transgénica	Fondo genético	Vector	Cebadores
<i>EBS::GUS</i>	Col	PBI 101.3	EBSp SalIF: CGTCGAC GTACTAGAGAGAGATTTC AAC EBSp BamHIR: C CGGATCC CATGGAAGCTAGGGTTTTTC
<i>SHL::GUS</i>	Col	PBI 101.3	SHLp SalIF: AA AGTCGAC TTTTTAAGGTGATATATTG SHLp BamHIR: TTTT GGATCC CATCTGAAACTGAAAGG

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de los promotores de *EBS* y *SHL*. En negrita se señalan los sitios de restricción de las enzimas *SalI* y *BamHI*.

Estos cebadores poseían dianas de restricción diseñadas para poder clonar el fragmento resultante de la amplificación en un pBluescript II KS. Una vez comprobado mediante secuenciación que el fragmento amplificado no contenía errores debidos a la reacción de PCR se transfirió al vector pBI101.3, de forma que ambos promotores quedaron fusionados transcripcionalmente con el gen delator *GUS* contenido en este vector. El vector, pBI101.3 es un vector binario que posee un origen de replicación para *E. coli* y *A. thumefaciens* y se usa para la generación de plantas transgénicas mediante la selección de transformantes en medio selectivo con antibióticos. Las cepas bacterianas se cultivaron en medio LB en presencia del correspondiente agente selectivo (Sambrook et al., 1989). Los cultivos de la cepa de *E. coli*, DH5 α , se mantuvieron en agitación a 37°C durante 14-16 horas, mientras que la cepa *A. thumefaciens* AGLO, se cultivó a 28°C durante 48 horas. 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 de las células se efectuó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células electrocompetentes de *A. thumefaciens* AGLO 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 de DNA bacteriano se realizó siguiendo los protocolos estándar (Sambrook et al., 1989).

5.2 Clonación de las proteínas completas de EBS y SHL y de los dominios PHD de ambas en vectores de expresión.

El cDNA completo de *EBS* y de *SHL*, así como el cDNA correspondiente al dominio PHD de EBS, se clonaron en vectores de expresión de proteínas de tipo pGEX (fusionados a glutathione S-transferase, GST) mediante el sistema Gateway (Invitrogen), utilizando los cebadores que se indican en la tabla 4. 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, (attB1: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACC y attB2: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC). Posteriormente y mediante una reacción BP con el enzima BP clonasa (Invitrogen) se clonaron en el vector pDONOR 221 y mediante una reacción de recombinación LR con el enzima clonasa LR (Invitrogen) se movilizaron los cDNAs completos de EBS y SHL y los dominios PHD de ambos, en el vector de expresión pGEX 2T compatible con el sistema Gateway (cedido por el laboratorio del Dr. Juan Carlos del Pozo).

En el caso del dominio PHD de la proteína SHL el sistema de clonación fue por el método clásico con enzimas de restricción. Los cebadores SHL PHD F y R (tabla 4) empleados para amplificar la zona codificante correspondiente poseen dianas de restricción diseñadas para poder clonar el fragmento resultante de la amplificación en un vector pGEMT easy (Promega), secuenciarlo y poder posteriormente volver a clonarlo en el vector pGEX de expresión de proteínas.

Para los experimentos de mutagénesis dirigida de residuos específicos de EBS y SHL o de sus dominios PHD se empleó el kit comercial QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la purificación de los fragmentos de DNA necesarios para las distintas estrategias de clonaje, las bandas obtenidas tras la separación electroforética se cortaron en forma de bloques de gel de agarosa para separarlos de los cebadores residuales de la reacción. La extracción del correspondiente fragmento se realizó en columnas de separación (QIAquick GEL Extraction kit QIAGEN, Alemania; GeneClean Q-BIOgene, MP Biomedicals USA) y secuenciados por el servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid de la U.C.M 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 y de la página web Tair de *Arabidopsis thaliana*. El modelado por homología de los dominios PHD se

llevó a cabo empleando el servidor de modelado Swiss-Model y las estructuras obtenidas se visualizaron con el programa informático Swiss-Pdb Viewer 4.01.

Construcción	Directo	Enzima	Reverso	Enzima
EBS Completa Sistema GW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAG GCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGC		GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCTTACCTT TTTCTGCGCTTCGT	
SHL Completa Sistema GW	GGAGATAGAACCATGCCCAAGCA AAAA		CAAGAAAGCTGGGTCACC TGGTCGCTTAGTGTGT	
EBS PHD Sistema GW	GGAGATAGAACCTACAAGGCTGCTACT GGC		CAAGAAAGCTGGGTCAGC TG GAGATGAAGTAAA	
SHL PHD	CCC GGATCC GAGGTTTTTCTCTCTGA CCAC	<i>BamHI</i>	CCC CTCGAG TTGTGGGG AACACTCTTC	<i>XhoI</i>
E-PHD _{W170A}	GGCTGCAAAGAC GCG TATCATCCT GCG		CGCAGGATGATA GCG GTC TTTGCAGCC	
S-PHD _{W163A}	GGAGTGTTCTGAG GCG TTTCATCCTT CTTG		CAAGAAGGATGAAA GCG CTCAGAACACTCC	

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los cDNAs completos de EBS y SHL o sus de los dominios PHD, así como los empleados para la generación de las correspondientes versiones mutadas. En negrita se señalan los sitios de restricción y el aminoácido modificado por mutagénesis.

6. Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

La transformación genética de plantas de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante el método de infiltración descrito por Clough y Bent (1998). Para ello las plantas T0 se cultivaron tal como se describe en el punto 2, en condiciones de DL hasta la aparición de la inflorescencia principal. Estas plantas T0 fueron sumergidas durante 5 minutos en una suspensión de células de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGLO que portan la construcción de interés. Posteriormente fueron llevadas de nuevo a la cámara climatizada con el fin de obtener las semillas T1. Estas semillas se esterilizaron y sembraron en condiciones de alta densidad en placas Petri con medio GM selectivo para así obtener las plantas transgénicas resistentes, que posteriormente fueron transplantadas a tierra. Para obtener líneas T3 homocigotas con una sola inserción, se seleccionaron sólo aquellas plantas T2 que presentaban una segregación 3:1 de sensibles al antibiótico y se llevaron a la siguiente generación las plantas que eran resistentes. De acuerdo con los datos de la segregación en la T3, se obtuvieron plantas homocigotas para la inserción en aquellas placas en las que no segregaban plantas sensibles.

7. Métodos histoquímicos.

7.1 Ensayos histoquímicos para la visualización de β -glucuronidasa.

La actividad del gen *uidA*, que codifica la β -glucuronidasa, se reveló mediante incubación a 37°C de tejidos o plántulas transgénicas en solución GUS (100mM de NaPO₄ (pH 7.2), 2,5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-glucuronidasa, 0.5 mM K₃Fe (CN)₆, 0.5mM K₄Fe(CN)₆ y 0.25% de Triton X-100) durante un tiempo que comprendió entre 1-24 horas dependiendo del experimento. Transcurrido este tiempo, se eliminaba la solución y las plantas se trataban con varios lavados de etanol 70% (v/v) hasta eliminar totalmente la clorofila de los tejidos. Para la observación de estas plantas se utilizaba una lupa binocular (Leica S6E).

8. Análisis de expresión.

8.1 Extracción de RNA y análisis de mRNA.

El análisis de expresión de genes de tiempo de floración se realizó mediante experimentos de northern blot o con transcripción reversa seguida de PCR. En ambos casos, 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 el protocolo del recomendado por el fabricante, a partir de material vegetal congelado y posteriormente pulverizado en mortero con N₂ líquido de forma similar a como se ha detallado en el caso del DNA. Además, se realizó un tratamiento en columna durante 15 minutos a temperatura ambiente con DNAsa libre de RNAsa, para eliminar cualquier rastro de DNA genómico en cada una de las muestras. La concentración de RNA total obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría (Sambrook et al., 1989) en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Para la cuantificación por northern blot del RNA mensajero de genes específicos, el RNA total se sometió a electroforesis en geles 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 empleado 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). A continuación el RNA total se transfirió a membranas Hybond-N+ (Amersham-Pharmacia) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para analizar la expresión de *SHL* mediante Northern-blot, empleamos una sonda del extremo 3' del cDNA que se generó por PCR con los oligos SHL nth F: AAACGACGACTTCTTCTG TCG y SHL nth R: TGAGAAACCACCATACGCTATAC y corresponde a una zona específica del gen *SHL*.

La expresión de *FVE*, *FLC* y *SOC1*, se analizó mediante hibridación tipo Northern usando entre 10 µg de RNA total. La expresión de *FVE* se detectó usando como sonda su cDNA completo (1,9 kb) obtenido por digestión del plásmido J3 con *SacII* y *NdeI*. En el caso de *FLC* se detectó su expresión utilizando un fragmento del cDNA de *FLC* que no contenía el dominio MADS-box. Dicho fragmento se obtuvo mediante digestión del cDNA completo de *FLC* clonado en un vector pGEMT (Promega) con los enzimas de restricción *EcoRI* y *SphI*. La sonda específica para *AGL20/SOC1* se obtuvo mediante digestión con *EcoRI* del cDNA completo del gen. El fragmento resultante de la digestión no contiene el dominio MADS-box y tiene un tamaño de aproximadamente 600 pb.

8.2 Reacción de la transcriptasa reversa seguida de amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Para la síntesis de cDNA total se utilizó el kit Super-Script™ First-Strand synthesis for RTPCR (Invitrogen, California USA) usando aproximadamente entre 3 y 5 µg de RNA total. El cDNA así resultante, se cuantificaba en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA). A continuación, se toman 2 µL para cada reacción de PCR de 20 µL de volumen final. Las condiciones de amplificación se ajustaron en cada caso con el fin de no saturar el resultado de la reacción tal y como se indica en la tabla 5 junto con los cebadores empleados para cada gen. 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 la *UBIQUITINA 10 (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.

8.3 Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos.

Los fragmentos de DNA utilizados como sonda 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 μ Ci de α -³²P-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 al DNA 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 tal y como se indicó 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.

Sonda	Programa	Directo	Reverso
<i>UBQ10</i>	94°(2') [94°(1') 67°(1') 72°(30'')]x20 72°(5') 4°(∞)	GATCTTTGCCGAAAAC AATTGGAGGATGGT	CGACTTGCATTAGAAAG AAAGAGATAACACG
<i>CO</i>	94°(2') [94°(30'') 60°(30'') 72°(30'')] x28 72°(5') 4°(∞)	CTCCTCGGCTTC GATTTCTC	CATTAACCATAACGCATA CATTTTC
<i>FT</i>	94°(5') [94°(1') 65°(1') 72°(35'')]x30 72°(1') 4°(∞)	ACAACCTGGAACAACCTTT GGCAATG	ACTATAGGCATCATCACGGT TCGTTACTGG
<i>SOC1</i>	94°(5') [94°(30'') 8°(30'') 72°(30'')]x30 72°(7') 4°(∞)	GGCATACTAAGGATCGA GTCAGCACCAAAC	ACCCAATGAACAATTGCGTC TCTACTTCAG
<i>TSF</i>	94°(5') [94°(30'') 60°(30'') 72°(15'')]x30 72°(5') 4°(∞)	GAGTCCAAGCAACC CTCACCAA	CACAATACGATGAATT CCCGAG
<i>MAF1</i>	94°(5') [94°(30'') 65°(30'') 72°(1')]x32 72°(5') 4°(∞)	ATGGTCTCATCGACAAA GCTCGAC	CTCTTAATTATGAATCAGGCT TTGAG
<i>MAF2</i>	94°(5') [94°(30'') 69°(30'') 72°(1')]x28 72°(5') 4°(∞)	GGGTAGAAAAAAGTCG AGATCAAGCGA	CTTGAGCAGCGGAA GAGTCTCC
<i>MAF3</i>	94°(5') [94°(30'') 65°(30'') 72°(1')]x35 72°(5') 4°(∞)	GAAGAAAAAAGCAAAC ACATTTTGGGTCC	AAGAACTCTGATATTTGTCT ACTAAGGTAC
<i>MAF4</i>	94°(5') [94°(30'') 69°(30'') 72°(1')]x35 72°(5') 4°(∞)	ATTAGGTCAGAAGAATTA GTCGGAGAAAAC	CTTGGATGACTTTTCCGTAG CAGGGGGAAG
<i>MAF5</i>	94°(5') [94°(30'') 69°(30'') 72°(1')]x35 72°(5') 4°(∞)	GGGGATTAGATGTGTTCG GAAGAGTGAAG	GATCCTGTCTTCCAAGGTAA CACAAAGG
<i>FLC</i>	94°(5') [94°(30'') 65°(30'') 72°(1')]x30 72°(5') 4°(∞)	TTAGTATCTCCGGCGACT TGAACCCAAACC	AGATTCTCAACAAGCTTCAA CATGAGTTTCG
<i>GA5</i>	94°(5') [94°(30'') 58°(30'') 72°(1')]x30 72°(5') 4°(∞)	CCAAGCTTCCATG GAAGGAG	ACATGGTCTTGGTGAAGGAT
<i>SHL</i>	94°(5') [94°(30'') 63°(30'') 72°(1')]x30 72°(5') 4°(∞)	ATGCCCAAGCA AAAAGCTC	CGGTAGTGAATTGTACTCG

Tabla 5. Programas de PCR y cebadores utilizados en los análisis de expresión de cada uno de los genes descritos.

9. Ensayos de expresión de proteínas, purificación y pull-down.

Para detectar la presencia de la proteína EBS en regiones reguladoras de sus genes dianas, se obtuvo un anticuerpo específico contra dicha proteína. Puesto que las secuencias de EBS y SHL son similares a lo largo de toda la proteína excepto en el extremo carboxilo, se eligió esta región para la obtención de un anticuerpo específico contra EBS (DDDVKKSQNGFTS). Este péptido se sintetizó en el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), y se empleó para producir sueros de conejo en la Unidad de experimentación de Farmacia de la Universitat de Barcelona empleando los métodos habituales.

9.1 Expresión de proteínas recombinantes.

Las proteínas fusionadas a GST se expresaron en la cepa BL21 rosetta de *E. coli*. La inducción de la expresión de las proteínas se realizó en cultivos en crecimiento exponencial con 0,1 mM de IPTG durante 2 horas en el caso de las proteínas completas EBS y SHL y 4 horas en el caso de los dominios PHD, en ambos casos a 37°C. Las proteínas resultantes fueron purificadas mediante el uso de una resina glutation sefarosa 4B. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%.

9.2 Ensayos de interacción in vitro de las proteínas recombinantes a péptidos de histona H3 o a histonas de Arabidopsis.

9.2.1 Ensayos de unión a los péptidos de Histona H3.

Los péptidos de histona H3 biotinilados utilizados fueron: H3 (12–357), H3K4me1 (12–563), H3K4me2 (12–460), and H3K4me3 (12–564), todos ellos de la casa comercial Upstate. La secuencia corresponde a los aminoácidos comprendidos entre 1–21: ART (meK) QTARKSTGGKAPRKQLA. Para los ensayos de unión, cada péptido (0.5 µg) se incubó con 1 µg de las proteínas recombinantes correspondientes (E-PHD, E-PHD_{W170A}, S-PHD y S-PHD_{W163A}) en un tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1% (vol/vol) Nonidet P-40, 1 mM PMSF durante 4 horas a 4 °C y con agitación. A continuación la resina se lavó 5 veces y las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron a membranas Inmobilon (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. La unión de las proteínas recombinantes a los péptidos biotinilados de histona H3 se detectó con Stretavidin-horsedish peroxidase conjugate (GE Healthcare). El revelado se llevó a cabo con un kit Inmobilon Western (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

9.2.2 Ensayos de unión a de las proteínas recombinantes a de histonas extraídas de un cultivo celular de Arabidopsis.

9.2.2.1 Extracción de las histonas de células en cultivo de Arabidopsis.

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 del cultivo celular, se utilizan 200 ml de un cultivo celular de Arabidopsis de 4 días. Las células se filtran en un kitasato, se congelan a -80°C y se homogenizan en un mortero sin dejar que se descogelen. A continuación se resuspenden en 100 ml de tampón NIB (10mM Tris-HCl pH 9,5, 10mM EDTA pH 8, 100mM KCl, 0,5M Sacarosa, 4mM espermidina, 1mM de espermina 0,1% de β - mercaptoetanol). A continuación, la suspensión de núcleos se filtra a través de una membrana miracloth y de una membrana de nylon de 30 μM de poro. Se mide el volumen y se añade tampón NIB-T diluyéndolo 1/20 (NIB con 10% de Tritón X 100). Se incuba a 4°C durante 15 minutos y se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos.

Para la obtención de las histonas a partir del extracto nuclear, se resuspenden los núcleos en 4 ml de tampón de lisis (320mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200mM Tris pH 8, 20mM EDTA pH 8, 5mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10% glicerol, inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail de Sigma), y se lisan mediante el empleo de ultrasonidos (3 pulsos de 10 segundos) . El extracto así obtenido se incuba 15 minutos a 4°C , se centrifuga a 12000 r.p.m 15 minutos y se almacena a -80°C . La cuantificación de las histonas extraídas de los cultivos celulares de Arabidopsis se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%.

9.2.2.2 Ensayos de unión de las proteínas recombinantes a histonas.

En estos ensayos se emplearon proteínas recombinantes expresadas como fusiones a GST, purificadas tal como se describió en la sección 9.1 y extractos de histonas obtenidos según el procedimiento descrito en el apartado 9.2.2.1. En primer lugar, la resina con las proteínas recombinantes unidas se sometieron a un tratamiento con BSA al 1% en un tampón PBS con Tween al 0,1% (PBST). A continuación la resina se lava 3 veces con PBST y se resuspende en un tampón de unión (50mM NaCl, 20mM Tris pH 7,5, 25% glicerol, 1,5mM MgCl_2 , 1mM PMSF, 0,02% Tritón X 100, 30mM Imidazol) al que se añaden 200 μg del extracto de histonas extraído del cultivo celular de Arabidopsis. Posteriormente, se incuba durante 2 horas a 4°C con agitación y se hacen 3 lavados de 10 minutos cada uno, uno de ellos con el tampón 2 (Tris pH 7,5 50 mM, 150 mM NaCl, 0,1% de Tritón X 100) y dos lavados más con PBST

1X (100mM Tris HCl pH 7,5, 150mM NaCl). 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 12%. A continuación se transfieren 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 anticuerpos α H3K4me3 y H4K20me3. El revelado se llevó a cabo con un kit Immobilon Western (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

10. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina.

Aproximadamente 300 mg de material vegetal fresco se embebieron en buffer A (400 mM sacarosa, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1% formaldehído), aplicando vacío durante 15 minutos; posteriormente se añadió glicina hasta una concentración final de 100 mM, y el tejido en suspensión se incubó durante 5 minutos más también aplicando vacío. Este material vegetal fijado se lavó dos veces durante 10 minutos con una solución de PBS que contiene inhibidores de proteasas (PBS 1X, 1 mM PMSF, 1 μ g/mL aprotinina, 1 μ g/mL pepstatina A). Una vez retirada dicha solución se procedió a congelar en N₂ (l) el material vegetal y se trituró hasta conseguir un polvo fino sin dejar que éste se descongele. El material congelado se resuspendió 1 mL de buffer de lisis (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1% triton X-100, 0.1% deoxicolato sódico, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, 10 mM butirato sódico, 1 μ g/mL aprotinina, 1 μ g/mL pepstatina A) y se sometió a tratamiento de ultrasonido durante 35 segundos con el propósito de provocar roturas en el DNA que rindieran fragmentos de entre 500 y 1000 pb. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 13000 r.p.m y el sobrenadante se incubó en agitación suave durante 1 hora con 60 μ L de DNAss/proteína A agarosa. Transcurrido este tiempo se centrifugaron las bolas de agarosa a 3000 r.p.m durante 2 min a 4°C y al sobrenadante se le añadieron 10 μ L del anticuerpo apropiado (α -H3K9K14Ac, α -H3K4me3, α -H3K27me3 (Upsdate) o α -EBS), dejándose en agitación suave durante una noche a 4°C, tras la cual se añadieron de nuevo 60 μ L de DNAss/proteína A agarosa y se dejó incubando durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaron los extractos a 3000 r.p.m durante 2 min a 4°C para sedimentar la matriz de agarosa. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron los extractos 2 min a 3000 r.p.m, se retiró el sobrenadante y el precipitado de la resina de agarosa se lavó repetidas veces con varias soluciones durante 5 minutos a 4°C, centrifugando durante 2 minutos a 3000 r.p.m y 4°C después de cada lavado. Primero se realizaron 2 lavados con buffer de lisis, un tercer lavado con LINDET (250 mM de

LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) y por último tres lavados con TE. Los complejos se eluyeron con 300 μ L de buffer de elución (1% SDS, 100 mM NaHCO₃), al que se le añadió 15 μ L de NaCl 5M y se dejó incubando 2 horas a 65°C. Posteriormente se incubó durante 1 hora a 45 °C con 20 μ L de buffer ProtK (1 μ g/ μ L proteinasa K; 10 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl pH 8.0) y el DNA resultante se purificó utilizando columnas de separación QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Alemania) de acuerdo con el protocolo establecido por el fabricante. Por último, se diseñaron pares de oligos de diferentes zonas genómicas de los loci *FT* y *SOC1* para utilizarlas como sondas identificativas de cada una de las marcas epigenéticas H3K9K14Ac, H3K4me3 y H3K27me3 o de la unión de EBS a la cromatina de *FT* (Tabla 6).

Locus	Región genómica	Directo	Reverso
<i>FT</i>	II	CTACAGTTGTTAGGCTATGGTTATAAG	TTTTTTATAACAAGCGGCC
<i>FT</i>	IV	TGTATTAGTGTGGTGGGTTTGG	AACTCTGCTTACTATAAGAGGGT
<i>FT</i>	VI	AAACCACCTGTTTGTTCAGATC	AAAGGAAAGCGTGGGGC
<i>FT</i>	VII	GGGATTTTTCTTTGTTCTCC	TATCTTAAAGGCTGGCTTGAATA
<i>SOC1</i>	I	ATCCTCGAAAGCTTCCTCCT	TTGTTTGGGTGGGAGAAGAC
<i>SOC1</i>	II	ATTCGCCAGCTCCAAGTACG	AATTGGCTACGAAAGAGCACA
<i>SOC1</i>	III	TGTGCTCTTTCGTAGCCAATT	TCTGAAACATCTGATCAAAAGCTG
<i>SOC1</i>	IV	CATTTGGTCCATTTGGGAAA	GTTTGGTGCTGACTCGATCC

Tabla 6. Cebadores utilizados en los análisis de las marcas epigenéticas H3K9,14Ac, H3K4me3 y H3K27me3 presentes en diferentes zonas genómicas de la cromatina de *FT* y *SOC1*. Los cebadores *FT* VI y *FT* VI se emplearon también para visualizar la presencia de EBS en la región genómica de *FT*.

RESULTADOS

1. La familia de genes homólogos al represor floral EBS en Arabidopsis.

EBS es una proteína nuclear que se caracteriza por presentar un dominio BAH en el extremo amino y un dominio PHD en el extremo carboxilo (Piñeiro et al., 2003). Existen proteínas con una alta homología de secuencia y la misma composición de dominios funcionales que EBS en Arabidopsis y en otras especies vegetales. Proteínas con esta arquitectura modular están presentes únicamente en plantas, pero no se han descrito en animales u otros organismos eucarióticos. Tanto el dominio BAH como el PHD aparecen en proteínas que forman parte de complejos implicados en la regulación de la expresión génica a través de procesos de remodelación de la cromatina (Aasland et al., 1995; Bienz, 2006; Champagne y Kutateladze, 2009). Esto sugiere que EBS y las proteínas relacionadas EBS-LIKE (EBL), actuarían como reguladores transcripcionales. En Arabidopsis existen dos proteínas de esta familia además de EBS: SHORT LIFE (SHL/EBL1) (Müssig et al., 2000) y una proteína predicha que hemos denominado EBL2 (The Plant Chromatin Database, www.chromdb.org). Los tres genes que codifican estas proteínas se localizan en el cromosoma cuatro de Arabidopsis (Fig. 4A). Como se muestra en la figura 4B las tres proteínas presentan un alto grado de homología entre ellas; EBS y EBL2 comparten el mayor nivel de similitud de aminoácidos (71%) mientras que SHL y EBL2 son las más divergentes, aunque el porcentaje de residuos similares es del 47%; EBS y SHL muestran un 58% de similitud (Fig. 4C).

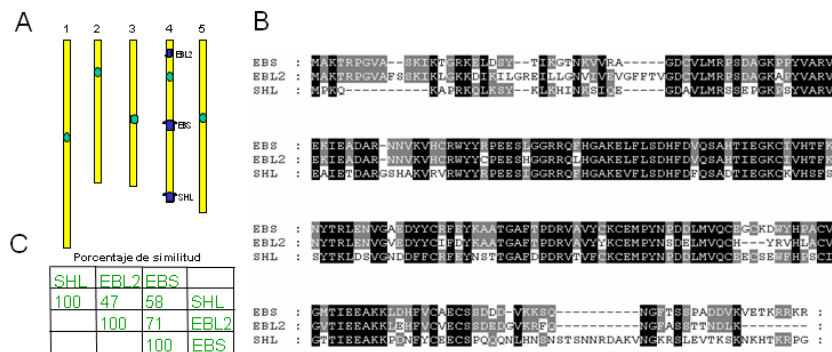


Fig 4. Familia de proteínas homólogas a EBS en Arabidopsis. A. Localización cromosómica de los genes *EBS* (At4g22140), *SHL* (At4g39100) y *EBL2* (At4g04260), que aparecen marcados como flechas azules; los círculos verdes señalan la posición de los centrómeros. B. Alineamiento de secuencia entre las proteínas EBS, y sus homólogos SHL y EBL2. Las cajas negras representan residuos idénticos o similares en las tres secuencias y las cajas grises en dos de ellas. C. Porcentaje de similitud expresada en tanto por ciento entre las proteínas de la familia EBS-LIKE.

Los dominios funcionales presentes en estas proteínas y los resultados obtenidos previamente con EBS (Gómez-Mena et al., 2001; Piñeiro et al., 2003) sugieren que otros

miembros de esta familia de reguladores transcripcionales podrían estar también implicados en la regulación de diferentes procesos de desarrollo. En concreto en este trabajo, nos hemos centrado en la caracterización funcional del gen *SHL* en *Arabidopsis*, analizando su papel en el control del tiempo de floración; asimismo, hemos llevado a cabo un análisis comparativo de la función de este locus y la de *EBS* en la regulación del desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*, estudiando su posible redundancia funcional. Además, hemos abordado el estudio de la función que desempeñan las proteínas EBS y SHL a nivel bioquímico, que ha permanecido totalmente desconocida hasta el momento.

2. Caracterización funcional del gen *SHL/EBL1* en *Arabidopsis*.

2.1 Análisis del patrón de expresión espacial de *SHL*.

Con el fin de determinar la regulación transcripcional que ocurre a nivel de *SHL*, hemos analizado en detalle su expresión. Para abordar el estudio de la expresión espacial de *SHL* empleamos RNA extraído de diferentes órganos de la planta: hoja, flor, yema floral, tallo y raíz. La secuencia del cDNA de *SHL* presenta un alto nivel de homología con *EBS*; por ello, para realizar los experimentos de hibridación con RNA mensajero total (Northern blot) utilizamos una sonda correspondiente al extremo 3' del mensajero de *SHL*, la zona más divergente entre ambos loci. De esta forma pudimos comprobar que el gen *SHL* se expresa a niveles muy similares en todos los órganos de la planta analizados, excepto en el tallo, donde se observa un nivel de expresión algo menor (Fig. 5). Mediante el empleo de una técnica con mayor sensibilidad de detección como la RT-PCR obtuvimos resultados muy similares (resultados no mostrados), confirmando así que *SHL* se expresa de manera general en todos los órganos de la planta. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente para *EBS* (Piñeiro et al., 2003).

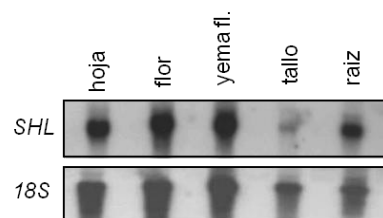


Fig.5. Expresión de *SHL* en distintos órganos de la planta de *Arabidopsis*. Para la hibridación de RNA se utilizaron 10µg de RNA total de los distintos órganos de la estirpe silvestre Col. Como sonda se utilizó un fragmento del cDNA de *SHL* amplificado con unos cebadores específicos del gen, correspondientes a la región 3' del mismo, que es la zona más divergente entre *EBS* y *SHL*. Como control de carga la membrana se hibridó con la sonda del DNA ribosomal 18S.

Asimismo y con el fin de analizar en detalle el patrón de expresión de *SHL* a nivel tisular, generamos líneas transgénicas en fondo Col-0 portadoras de construcciones en las que la región promotora de dicho gen dirige la expresión del gen delator *GUS* (*SHL::GUS*). Para realizar dicha construcción se utilizó un fragmento de 2,3 kb que contiene la región promotora de *SHL*, desde el codón de terminación del gen anterior (At4g39110) al codón de inicio de la traducción de *SHL*. De forma paralela, con el fin de analizar la expresión del gen *EBS* mediante un procedimiento idéntico y compararla con la de *SHL* generamos construcciones reportadoras de la expresión de *EBS*, *EBS::GUS*. En el caso de *EBS*, el tamaño de la región promotora empleada fue de 1 kb, que nuevamente contenía la totalidad de las secuencias intergénicas entre *EBS* y el locus situado aguas arriba de éste (At4g22150). Para *SHL* se analizaron 16 líneas transgénicas independientes y 14 para *EBS*; de estas líneas, ocho con un patrón de expresión similar se emplearon para seleccionar plantas portadoras de una única inserción. Finalmente, se analizó en detalle el patrón de expresión del gen reportador *GUS* en dos líneas homocigotas para *EBS::GUS* y en dos líneas igualmente homocigotas para *SHL::GUS*. La figura 6 muestra el patrón obtenido con una de estas líneas para cada construcción a lo largo de distintos estadios de desarrollo, que van desde el momento de exposición de la semilla a la luz tras el periodo de estratificación, hasta el desarrollo de inflorescencias y flores. Como puede observarse se detecta expresión de *GUS* en ambas líneas en el momento de exposición de la semilla a condiciones normales de crecimiento (luz y temperatura) así como tras un día de cultivo (D0 y D1), aunque la intensidad de la señal es débil en ambos casos y ligeramente superior en las plantas *EBS::GUS*. En plántulas de tres días (D3), se detecta la expresión de *GUS* tanto en los cotiledones como en el hipocotilo, al igual que en D7, donde además se aprecia la señal de *GUS* en las primeras hojas verdaderas. La expresión de *EBS* y *SHL* se mantiene en estadios posteriores del desarrollo vegetativo (D15) así como en los distintos órganos de la flor. Por último, y de acuerdo con los datos de northern blot, *SHL* se expresa a niveles más bajos en el tallo de la inflorescencia. Por lo tanto, *SHL*, al igual que *EBS*, muestra un patrón de expresión ubicuo, expresándose en todos los órganos de la planta y en todos los estadios de desarrollo. Estas observaciones son consistentes con los datos de expresión disponibles para *SHL* y también para *EBS* en bases de datos de expresión públicas como el "Arabidopsis eFP Browser": <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi?primaryGene=AT4G39100&modelInput=Absolute> (Winter et al., 2007). Este patrón de expresión general observado para *SHL* es consistente con la hipótesis de que este gen esté implicado en el control de diversos procesos de desarrollo de la planta.

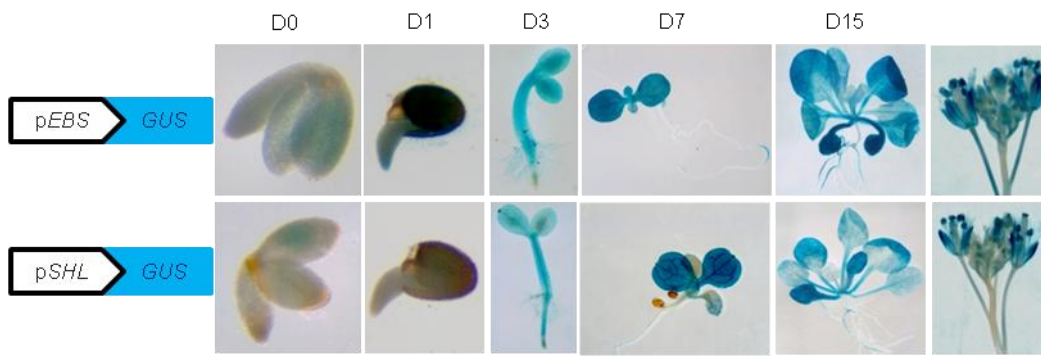


Fig.6. Análisis de expresión dependiente del promotor de los genes *EBS* y *SHL* fusionado al gen reportador *GUS*. El análisis se llevó a cabo en semillas de 0 y 1 día de edad tras la exposición de las semillas a condiciones normales de crecimiento (en D0 se extrajo la planta de la cubierta) y en plántulas Col-0 de 3, 7 y 15 días respectivamente cultivadas en condiciones de fotoperiodos de DL. El último panel corresponde al ápice de la inflorescencia de plantas de 30 días.

2.2 Análisis temporal de la expresión de *SHL*.

Para determinar si existe una regulación temporal de la expresión del gen *SHL*, decidimos analizar también si su expresión variaba a lo largo del ciclo diario y tras diferentes días de crecimiento de la planta. Para ello se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR con RNA obtenido de la parte aérea de plántulas de 14 días recolectadas cada 3 horas durante un día completo en condiciones de DL. Como puede verse en la figura 7, el gen *SHL* se expresa con niveles similares a lo largo de todo el día, y no presenta ningún pico de expresión significativo. Por lo tanto, la expresión de *SHL*, tal como sucede con *EBS* (Piñeiro et al., 2003), no está sometida a una oscilación circadiana. Estos datos son consistentes con el patrón de expresión de *SHL* disponible en atlas de expresión en los que están recopilados datos de expresión circadiana para genes de *Arabidopsis*, arroz y álamo: <http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/temporaryfiles/1277730620.html> (Mockler et al., 2007; Michael et al., 2008).

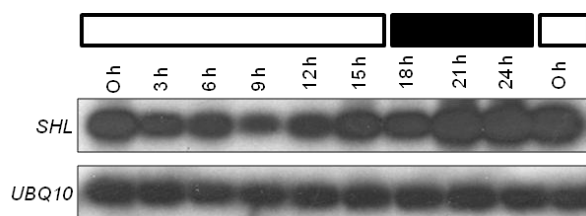


Fig.7. Análisis de la expresión del gen *SHL* a lo largo del ciclo diario. A. El análisis se llevó a cabo en plántulas del ecotipo silvestre *Ler* de 14 días de edad cultivadas en condiciones de DL y recolectadas cada 3 horas. Los cebadores utilizados, comprenden la región génica entre el inicio del primer exón y el final del segundo (RT-PCR, *SHL*, materiales y métodos, tabla 5). La expresión del gen de la *UBIQUITINA 10 (UBQ10)*, no sujeta a regulación circadiana se muestra como control de carga.

También se analizó la expresión del gen *SHL* a lo largo de distintos días iniciales del desarrollo de la planta; para ello se recogieron plántulas cultivadas en condiciones de DC tras diferentes días después de la germinación (15, 20 y 25) a 0 y 8 horas desde el inicio del periodo de luz y se determinó la expresión del gen mediante experimentos de RT-PCR. Como puede observarse en la figura 8, no se aprecian cambios en la expresión del gen *SHL* a lo largo de los distintos días analizados, y de acuerdo con el experimento anterior, tampoco se observan diferencias de expresión entre primera y última hora del día. Por tanto, los niveles de expresión del RNA mensajero de *SHL* no parecen estar sometidos a una regulación temporal ya que no se observan cambios en la expresión del gen a distintos días.

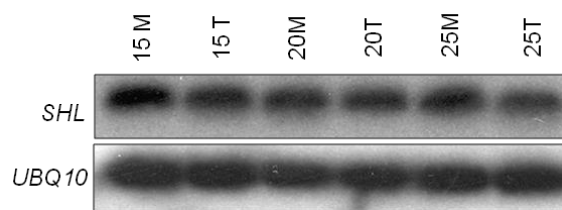


Fig.8. Análisis de la expresión del gen *SHL* a lo largo de estadios iniciales del desarrollo. El análisis se llevó a cabo en plántulas del ecotipo silvestre *Ler* de 15, 20 y 25 días de edad cultivadas en condiciones de DC. Las muestras se recogieron a primera hora del día (0 horas; M) y a última hora de la tarde (8 horas; T). Se emplearon los cebadores descritos en la figura 7. La expresión del gen de la *UBQ10* se muestra como control de carga.

2.3 Análisis funcional de *SHL*.

La arquitectura funcional de *SHL* sugiere que, al igual que *EBS*, esta proteína podría estar implicada en la regulación de procesos de desarrollo en *Arabidopsis*. Con el fin de analizar la posible función del gen *SHL* en el control del desarrollo, y en particular en la regulación del tiempo de floración, hemos empleado una estrategia de genética inversa. Para ello hemos obtenido a partir de colecciones públicas, dos mutantes de inserción en dicho gen (*At4g39100*). Una de estas líneas mutantes, *shl-1*, es portadora de una inserción de T-DNA en el segundo intrón del gen y procede de la colección de Alonso y Ecker (Alonso et al., 2003), generada en fondo Col. La segunda línea, *shl-2*, presenta un elemento transponible de tipo *Dissociation (Ds)* insertado en la región 5'-UTR, y procede de la colección generada por el Dr. Martiensen, en fondo *Ler* (<http://genetrp.cshl.org/>)(Fig. 9). La localización exacta de las inserciones se determinó secuenciando un fragmento de PCR generado empleando cebadores específicos del T-DNA o el *Ds* y de las zonas genómicas adyacentes (Materiales y Métodos).

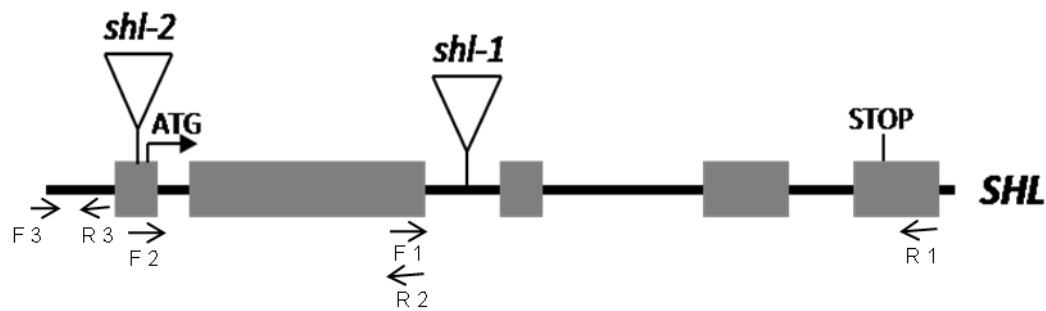


Fig. 9. Estructura génica de *SHL* (=EBL1) y mapa de inserciones en el gen. Las cajas grises representan los exones, la línea negra los intrones y las regiones 5' y 3', los triángulos invertidos las inserciones que dan lugar a las mutaciones *shl-1* y *shl-2*. Las flechas F1, R1 representan los cebadores utilizados para generar la sonda empleada en el análisis de la expresión de *SHL* mediante técnicas de northern blot. F2 y R2, los cebadores empleados para analizar la expresión de *SHL* mediante experimentos de RT-PCR (Fig. 11B) y por último, las flechas F3, R3 representan los cebadores empleados para el diseño de la sonda utilizada en el experimento de Southern blot genómico (Fig. 10).

La presencia de las inserciones en la región genómica de *SHL* se confirmó mediante experimentos de hibridación de DNA genómico (Southern blot). Para realizar estos experimentos empleamos como sonda específica un fragmento de 600 pb correspondiente a las regiones reguladoras del gen *SHL* (Fig. 9, sonda generada con los cebadores F3 y R3). Como se puede observar en la figura 10, esta sonda identifica los fragmentos de restricción del tamaño esperado en los parentales silvestres *Ler* y *Col* (7,5 kb para *EcoRI* y 1,9 y 0,7 kb para *HindIII*); en las líneas mutantes *shl-1* y *shl-2* se observa un cambio en la movilidad de los fragmentos de restricción reconocidos por la sonda como consecuencia de las inserciones presentes en cada uno de los alelos, lo que nos permitió concluir que las inserciones en las líneas mutantes seleccionadas están dentro de la región genómica de *SHL*.

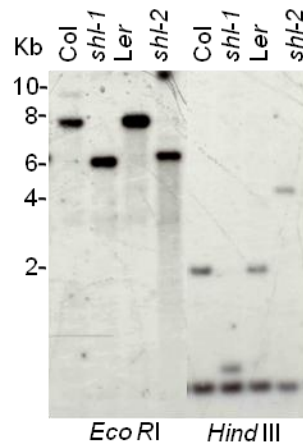


Fig. 10. Detección por hibridación del locus *SHL* en los alelos *shl-1*, *shl-2* y en las correspondientes accesiones silvestres, Col y Ler. Para la hibridación de DNA se utilizaron por cada carril 5 µg de DNA genómico digerido con las enzimas *EcoRI* y *Hind III*, y como sonda se utilizó un fragmento de PCR amplificado con los cebadores F3 y R3 (Fig. 9).

Para determinar cómo afectan las inserciones presentes en los alelos *shl-1* y *shl-2* a la expresión del gen *SHL* hemos realizado experimentos de hibridación con RNA total (Northern blot) y experimentos de RT-PCR. Como se observa en la figura 11 A, a diferencia de los parentales silvestres, ninguno de los alelos obtenidos muestra niveles detectables del RNA mensajero del gen cuando se emplea como sonda una zona correspondiente al extremo 3' del mensajero. La sonda utilizada en este experimento se representa en la figura 9, y corresponde a la región 3' del gen (Fig. 9, cebadores F1 y R1). Puesto que, el alelo mutante *shl-1* es portador un T-DNA en el segundo intrón, no podemos descartar que se esté formando una proteína truncada que mantenga cierta actividad. Para comprobar si se detecta la presencia del extremo 5' del RNA mensajero de *SHL* en el alelo *shl-1*, realizamos un experimento de RT-PCR empleando en este caso cebadores que amplifican la región génica desde el codón de iniciación hasta el final del segundo exón (Fig. 9 cebadores F2 y R2). En este caso, y tal como se observa en la figura 11 B, no se detecta expresión del mensajero en el alelo mutante *shl-2*, mientras que sí se detecta expresión en el alelo *shl-1*. Por lo tanto, mientras que el mutante *shl-2* sería portador de un alelo nulo, *shl-1* podría codificar una proteína truncada que conservase cierta actividad ya que la situación del T-DNA permitiría que se expresase el dominio BAH íntegro y la parte inicial del dominio PHD de la proteína SHL.

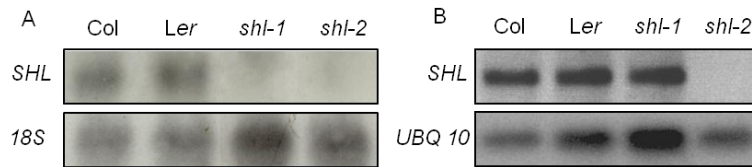


Fig. 11. Expresión del gen *SHL* en los alelos mutantes *shl-1* y *shl-2*. A. Análisis de la expresión de *SHL* en los alelos mutantes mediante un experimento de northern blot. Para la hibridación de RNA se utilizaron 10 µg de RNA total extraído de plantas cultivadas durante 10 días en condiciones de DL y como sonda se utilizó un fragmento correspondiente a la región 3' de *SHL* comprendida entre los cebadores F1 y R1 (Fig. 9). Como control de carga la membrana se hibridó con la sonda del DNA ribosomal 18S. B. RT-PCR con 5µg de RNA total extraído de plantas cultivadas durante 10 días en condiciones de DL. Se emplearon los cebadores F2 y R2 (Fig. 9). La expresión del gen *UBQ10* se muestra como control de carga.

2.4 Caracterización fenotípica de los mutantes *shl-2*.

Con el fin de determinar la posible función de *SHL* en el control del tiempo de floración así como en otros aspectos del desarrollo, llevamos a cabo un análisis detallado del fenotipo de los mutantes *shl*. La observación del alelo mutante *shl-1* cultivado en distintas condiciones de fotoperiodo (DL y DC) no muestra ninguna alteración visible en comparación con el parental silvestre Col; tanto la arquitectura y la morfología general de la planta y de sus distintos órganos como el tiempo de floración fueron indistinguibles de los del ecotipo silvestre (Fig. 12). En cambio *shl-2* sí presenta una aceleración del tiempo de floración con respecto al ecotipo silvestre *Ler*, siendo el fenotipo de floración temprana más claro en condiciones de DC (Fig. 12). Esta disminución del tiempo de floración, aunque es menor que la observada en mutantes *ebs* (Gómez-Mena et al., 2001), sugiere que *SHL* también desempeña un papel en la represión del inicio de la floración. El hecho de que el alelo mutante *shl-1* no presente fenotipo de floración temprana en las condiciones empleadas podría deberse a que *shl-1* está en fondo Columbia, un fondo genético diferente al de *shl-2* y *ebs* que se aislaron en fondo *Ler*, o bien que *shl-1* no sea un alelo nulo, y que la proteína truncada que se genera en el alelo *shl-1* conserve cierta actividad.

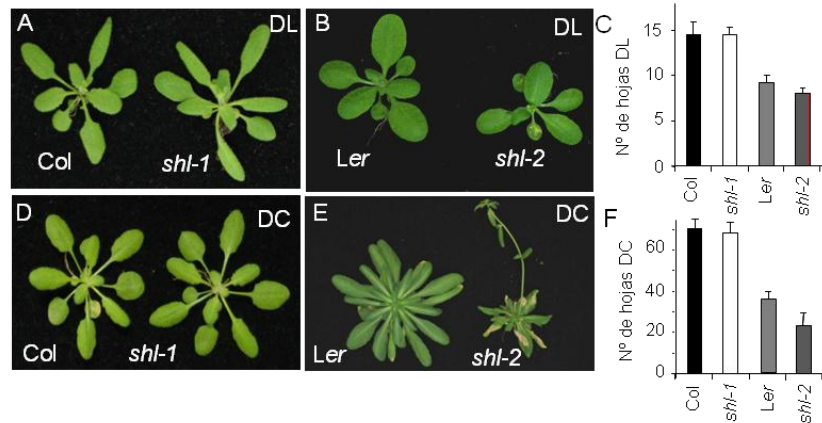


Fig. 12. Fenotipo de floración de los mutantes *shl*. A y B. Plantas Col, *shl-1*, Ler y *shl-2* cultivadas en condiciones de DL. C. Cuantificación del tiempo de floración medido como número de hojas totales de los mutantes *shl-1* y *shl-2* y sus parentales silvestres correspondientes en las condiciones anteriores. D y E. Plantas Col, *shl-1*, Ler y *shl-2* cultivadas en condiciones de DC. F. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes *shl-1* y *shl-2* y sus parentales silvestres correspondientes en las condiciones anteriores.

Puesto que los mutantes *shl-2* muestran una menor duración del desarrollo vegetativo, decidimos determinar si esta disminución afectaba a todas las fases del crecimiento vegetativo o a alguna de ellas en particular. Para ello, analizamos las fases de desarrollo vegetativo cuantificando el número de hojas juveniles, adultas y caulinares en las plantas mutantes *shl-2* cultivadas en DL y DC. La identificación de cada fase se realizó en base a la distribución de tricomas en la cara abaxial y adaxial de las hojas y a la morfología de las mismas (ver Materiales y Métodos). Como puede observarse en la figura 13, el mutante *shl-2* no tiene alterada la fase juvenil del desarrollo ni el número de hojas caulinares, por lo que la disminución de la duración del desarrollo vegetativo del mutante con respecto a Ler se debe a cambios en la duración de la fase adulta, al igual que ocurre en el mutante *ebs* (Gómez-Mena et al., 2001) y en otros mutantes de floración temprana (Jarillo et al., 2009).

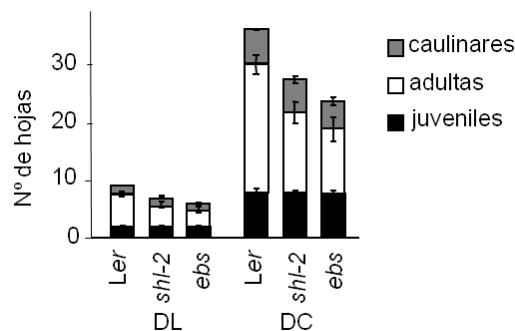


Fig. 13. Duración de las fases de desarrollo vegetativo del mutante *shl-2*. Cuantificación del número de hojas juveniles, adultas y caulinares de los mutantes *shl-2* y *ebs* con respecto al ecotipo silvestre Ler. Las plantas se cultivaron en condiciones de DL y DC.

La observación visual del mutante *shl-2* indica que sufre otras alteraciones fenotípicas además de los cambios observados en el tiempo de floración, por lo cual hemos realizado una caracterización morfológica detallada del mutante *shl-2*. Al igual que en la determinación de la duración de las fases de desarrollo vegetativo, hemos incluido en el análisis al mutante *ebs* con el fin de comparar el efecto de ambas mutaciones sobre el desarrollo de la planta. De acuerdo con resultados anteriores de nuestro grupo, las mutaciones en *EBS* producen alteraciones considerables sobre el desarrollo de la roseta e inflorescencia, causando una disminución significativa de su tamaño (Gómez-Mena et al., 2001). Como se observa en la figura 14, los mutantes *shl-2* también muestran menor diámetro de la roseta y de la longitud de la inflorescencia en comparación con el tipo silvestre *Ler*, aunque el efecto es menor que en el caso de mutantes *ebs*.

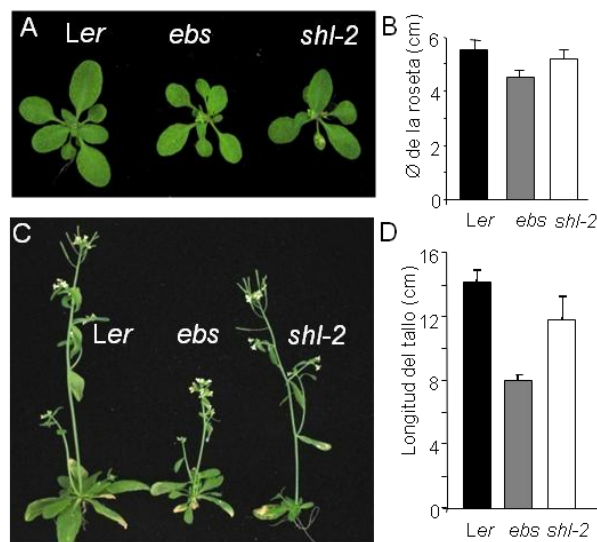


Fig.14. Tamaño de roseta y longitud de la inflorescencia del mutante *shl-2*. A. Se muestra el diámetro de la roseta expresado en cm en mutantes *shl-2* y *ebs* y en el ecotipo silvestre *Ler*. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tamaño de roseta en plantas *Ler*, *ebs* y *shl-2*. C. Longitud de la inflorescencia de los mutantes *shl-2* y *ebs* y del ecotipo silvestre *Ler*. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de DL. D. Cuantificación de la longitud de la inflorescencia en plantas *Ler*, *ebs* y *shl-2*.

Las flores de *Arabidopsis* presentan un número de órganos que se ajusta al patrón conservado en las crucíferas de cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y dos carpelos fusionados. Al contrario que en los mutantes *ebs*, las flores de *shl-2* no presentan alteraciones morfológicas apreciables y son muy similares a las flores de *Ler* (Gómez-Mena et al., 2001). Sin embargo, el tamaño de los frutos en los mutantes *shl-2* muestra una reducción significativa, que de nuevo es intermedia entre el de *Ler* y el del mutante *ebs* (Fig. 15).

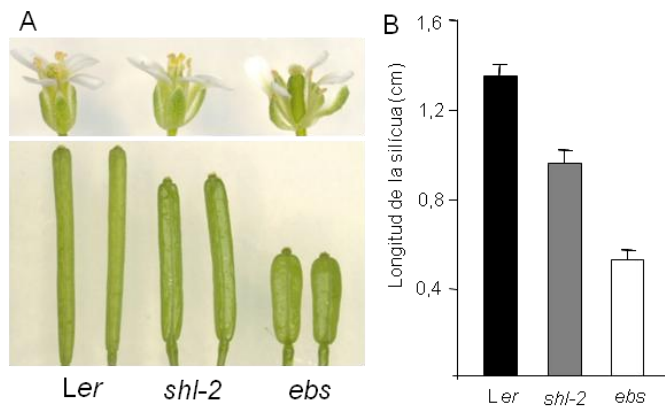


Fig. 15. Caracterización morfológica de flores y frutos del mutante *shl-2*. A Fenotipo de flores y frutos de los mutantes *shl-2*, *ebs* y del ecotipo silvestre *Ler*. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de DL. B. Tamaño de las silicuas de los genotipos anteriores expresado en centímetros.

Así pues, aunque el fenotipo de *shl-2* muestra alteraciones menos severas que el de los mutantes *ebs*, también presenta otros defectos, además del tiempo de floración, lo que sugiere que *SHL*, al igual que *EBS*, podría participar en el control de otros procesos del desarrollo además del inicio de la floración (Gómez-Mena et al., 2001).

Las líneas de silenciamiento del gen *SHL* presentan senescencia prematura de sus hojas, un rasgo característico que está en el origen del nombre asignado a este locus, *SHORT LIFE* (Müssig et al., 2000). De acuerdo con estas observaciones previas, las hojas de roseta del mutante *shl-2* también muestran este fenotipo de senescencia prematura que conduce a que comiencen a amarillear mucho antes que su parental silvestre *Ler*, como puede apreciarse en la figura 16.



Fig. 16. Fenotipo de senescencia prematura de los mutantes *shl-2*. A. Fenotipo de los mutantes y de su parental silvestre *Ler*. Plantas cultivadas en DL durante 20 días. B. Detalle de la senescencia de las hojas del mutante, las hojas corresponden a la roseta de las plantas del panel A.

2.5 Análisis del tiempo de floración de los alelos *shl-1* y *shl-2* introgresados en fondos genéticos recíprocos.

Con el fin de evaluar el efecto del fondo genético sobre el fenotipo observado en los mutantes *shl* y comprobar si el fenotipo temprano de *shl-2* se mantiene en un fondo genético Col, portador de un alelo activo de *FLC*, introgresamos el alelo *shl-2* en un fondo Col mediante tres retrocruzamientos sucesivos. Además, la disponibilidad de este alelo en un fondo genético Col nos permite realizar los análisis genéticos oportunos entre este alelo y otros mutantes de tiempo de floración en este mismo fondo genético. Del mismo modo introgresamos el alelo *shl-1* en fondo genético *Ler* para comprobar si la ausencia de fenotipo de floración temprana en fondo Col se podría deber a la presencia de un alelo activo de *FLC*. Al igual que en el caso de *shl-2*, introgresamos el alelo *shl-1* en fondo genético *Ler* mediante tres retrocruzamientos. Tal como se observa en la figura 17, los mutantes *shl-2* introgresados en fondo genético Col son más tempranos que el ecotipo silvestre tanto en condiciones inductivas de DL como en DC, aunque en dicho fondo genético el efecto de la mutación *shl-2* sobre el tiempo de floración es considerablemente más moderado que en fondo genético *Ler*. Asimismo, los mutantes *shl-1* no presentan un fenotipo de floración temprana con respecto a *Ler*, tal como ocurría en dichos mutantes en fondo genético Col. Esto sugiere que el fondo genético no es el responsable de las diferencias fenotípicas observadas para el tiempo de floración del mutante *shl-1*, aunque sí parece modificar el grado de severidad del fenotipo de floración del alelo *shl-2*.

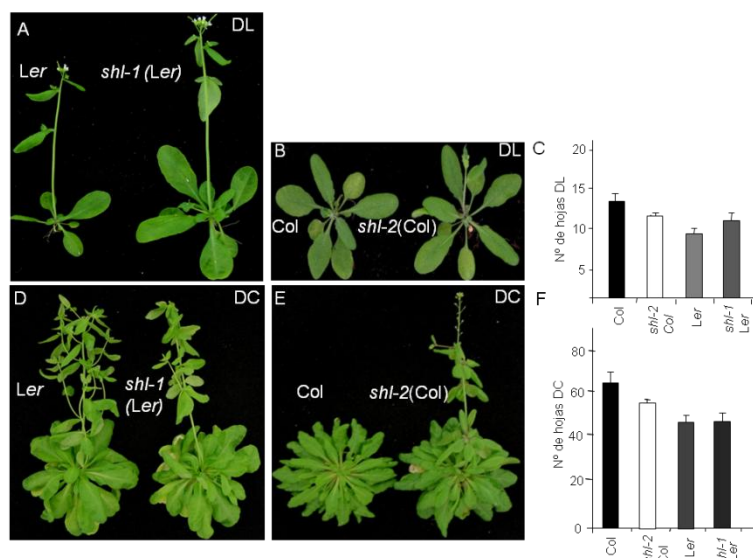


Fig. 17. Fenotipo de floración del alelo *shl-2* en fondo Col y del alelo *shl-1* en fondo *Ler*. A Fenotipo del mutante *shl-1* en fondo *Ler* en condiciones de DL. B. Fenotipo del mutante *shl-2* en fondo Col en DL. C. Cuantificación del tiempo de floración de las plantas mostradas en las figuras A y B. D. Fenotipo de *shl-1* en fondo *Ler* en condiciones de DC. E. Fenotipo de *shl-2* en fondo Col en DC. F. Cuantificación del tiempo de floración de plantas mostradas en las figuras D y E.

2.6 Análisis genético con mutantes *shl-2*.

2.6.1 Estudio de la posible redundancia funcional de *SHL* y *EBS*.

EBS y *SHL* comparten un alto grado de homología de secuencia y forman parte de la misma familia de proteínas. Además, los genes que codifican estas proteínas muestran un patrón de expresión similar, detectándose el transcrito correspondiente a los dos loci en todos los órganos de la planta y estadios de desarrollo analizados. Por ello es posible, que los dos genes puedan desempeñar funciones similares en la regulación del desarrollo, y en particular del tiempo de floración en *Arabidopsis*. Las plantas portadoras de mutaciones en el gen *EBS* y plantas KO para el gen *SHL* muestran alteraciones en el desarrollo y en particular en el tiempo de floración, lo que indica que ambos genes no desempeñan funciones totalmente redundantes aunque sí podrían tener funciones parcialmente solapantes en el control del desarrollo de *Arabidopsis*. Para determinar si ambos genes tienen funciones redundantes en el control del tiempo de floración hemos generado dobles mutantes *shl ebs*. Como se observa en la figura 18, el doble mutante *shl-2 ebs* muestra un fenotipo de floración más temprano que cada uno de los parentales cuando se cultiva en condiciones de DL; en condiciones de DC, el doble mutante presenta un fenotipo de floración temprana muy extremo, y de hecho, las plantas *shl-2 ebs* son prácticamente insensibles a fotoperiodo. Además, estas plantas muestran un fenotipo enano con alteraciones pleiotrópicas del desarrollo que afectan a todos los órganos aéreos de la planta y que causan una disminución drástica de la fertilidad de las plantas dobles mutantes.

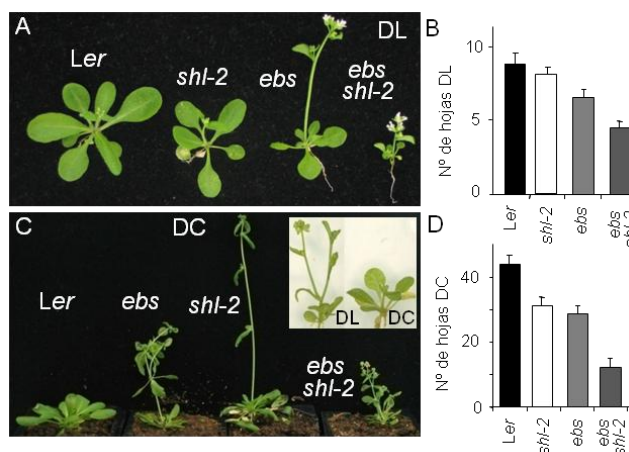


Fig. 18. Fenotipo de floración los dobles mutantes *shl-2 ebs*. A. Fenotipo de las plantas *Ler*, *shl-2*, *ebs* y *ebs-shl-2* cultivadas en condiciones de DL. B) Cuantificación del tiempo de floración de dichos mutantes. C) Fenotipo de las plantas, *Ler*, *ebs*, *shl-2* y *ebs-shl-2* cultivadas en condiciones de DC. El inserto en la esquina superior derecha muestra plantas dobles mutantes cultivadas durante 15 días en condiciones de DL y DC. D) Cuantificación del tiempo de floración de dichos mutantes.

Con el fin de analizar si el alelo mutante *shl-1* muestra el mismo comportamiento en ausencia de un gen *EBS* funcional, generamos el doble mutante *ebs shl-1*; puesto que *shl-1* está en fondo Col, introgresamos *shl-1* en fondo genético *Ler*, el mismo que *ebs*, mediante retrocruzamientos sucesivos. A pesar de que *shl-1* no muestra ningún fenotipo de floración apreciable, el doble mutante *ebs shl-1* muestra el mismo fenotipo de floración extremadamente temprano que el del doble *shl-2 ebs*, así como pérdida de sensibilidad al fotoperiodo (Fig. 19). Estos resultados indican que *SHL* tiene funciones al menos parcialmente redundantes con *EBS* en el control del inicio de la floración y también en otros aspectos del desarrollo.

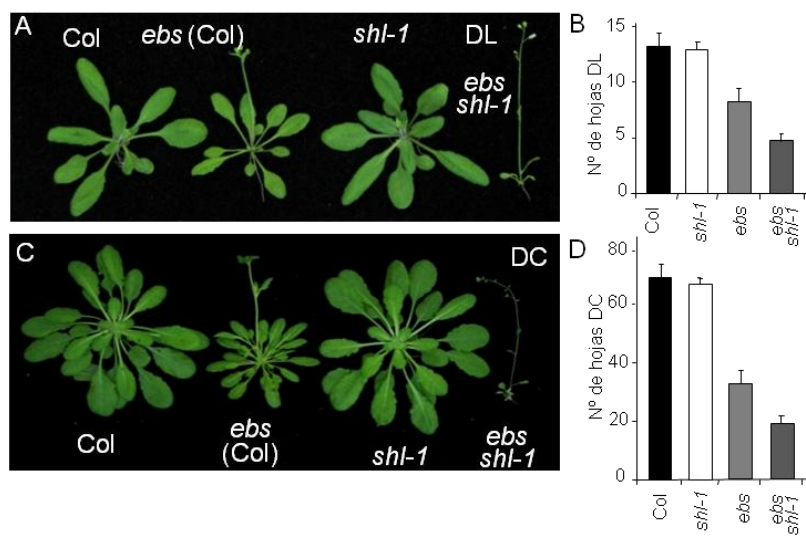


Fig.19. Fenotipo de floración de los dobles mutantes *shl-1 ebs*. A. Plantas Col, *ebs* (Col), *shl-1* y *ebs-shl-1* cultivadas en condiciones de DL. B) Cuantificación del tiempo de floración de dichos mutantes. C) Plantas Col, *ebs* (Col), *shl-1* y *ebs-shl-1* cultivadas en condiciones de DC. D) Cuantificación del tiempo de floración de dichos mutantes.

También analizamos el fenotipo de las flores y los frutos de los dobles mutantes *shl-2 ebs* y *shl-1 ebs*. Las flores de los dobles mutantes no muestran alteraciones homeóticas, y mantienen la disposición de cuatro sépalos, cuatro pétalos, seis estambres y dos carpelos fusionados, aunque el tamaño de los sépalos y los pétalos es significativamente menor que el de los mutantes *shl* y *ebs*. Los estambres también presentan alteraciones extremas del fenotipo, menor tamaño que los del tipo silvestre y contienen una cantidad de polen muy reducida (Fig. 20 A y C). En el caso de los frutos también observamos una disminución muy acusada de la longitud de la silicua, y mayor que la observada para los mutantes *ebs* en ambos dobles mutantes (Fig. 20 B, D y E), lo que explicaría la reducción de la fertilidad de las plantas *shl-2 ebs* y *shl-1 ebs*. Así pues, el fenotipo de los dobles mutantes *shl-2 ebs* y *shl-1 ebs* muestra

defectos mucho más severos que los de los mutantes sencillos *shl-2* y *ebs*, lo que de nuevo sugiere que ambos genes podrían desempeñar funciones al menos, parcialmente redundantes en el control del desarrollo de flores y frutos en Arabidopsis.

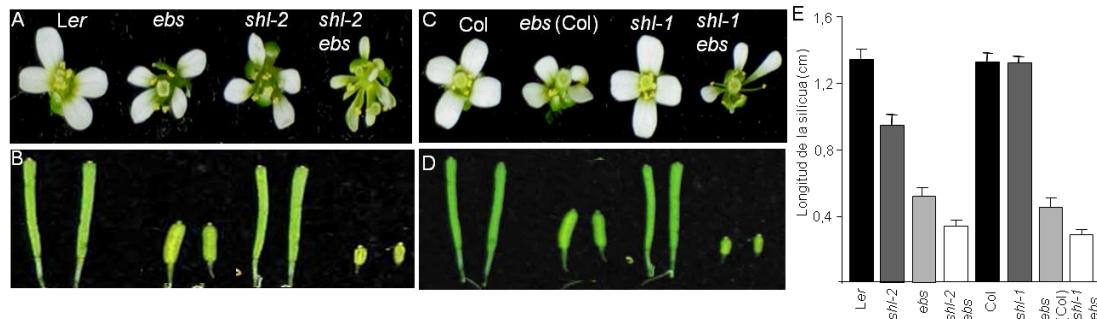


Fig. 20. Caracterización morfológica de flores y frutos de los dobles mutantes *shl-2 ebs* y *shl-1 ebs*. A Fenotipo de flores de los dobles mutantes *shl-2 ebs*, de los mutantes sencillos *shl-2* y *ebs*, y del ecotipo silvestre Ler. B Fenotipo de frutos de los genotipos anteriores. C. Fenotipo de flores de los dobles mutantes *shl-1 ebs*, de los mutantes *shl-1*, *ebs* y del ecotipo silvestre Col. D. Fenotipo de los frutos de los genotipos en C. E. Cuantificación de la longitud de las silicuas de las plantas anteriores expresada en cm. Todas las plantas empleadas para el análisis fueron cultivadas en condiciones de DL.

2.6.2 Interacción de *SHL* con las rutas de inducción de la floración.

Clásicamente, el análisis fenotípico de dobles mutantes que presentan un fenotipo de floración tardío ha sido utilizado para establecer las relaciones genéticas entre los loci implicados en las rutas que promueven la floración en Arabidopsis (Putterill et al., 1995; Koornneef et al., 1998a; Koornneef et al., 1998b; Simpson et al., 1999; Reeves y Coupland, 2001). Aunque el análisis de estos dobles mutantes ha permitido proponer la existencia de una serie de rutas inductoras de la floración, queda aún por definir con exactitud la función de muchos de los represores florales identificados y en qué punto de esta intrincada red genética actuarían. El análisis de la interacción genética entre *EBS* y *SHL* sugiere que ambos genes tienen funciones parciales pero no totalmente redundantes en el control del tiempo de floración. Esto sugiere que ambos loci podrían llevar a cabo funciones independientes en el control de este proceso de desarrollo en Arabidopsis. Con el fin de establecer la relación entre el locus *SHL* y las rutas de regulación del tiempo de floración establecidas en el modelo genético conceptual del control del tiempo de floración, generamos y analizamos plantas dobles mutantes portadoras de mutaciones en el locus *SHL* y en otros loci representativos de distintas rutas de inducción que controlan el tiempo de floración en Arabidopsis. En concreto se analizaron las relaciones genéticas con genes de la ruta del fotoperiodo, de la ruta autónoma,

de la ruta de las giberelinas y también las posibles interacciones con los integradores florales *FT* y *SOC1* puesto que *EBS* reprime la expresión de *FT* (Piñeiro et al., 2003).

2.6.2.1 Interacción de *SHL* con la ruta del fotoperiodo.

Como se comentó previamente en la introducción, la ruta del fotoperiodo se definió en base a mutantes que presentaban un fenotipo de floración tardía en condiciones de DL y no en DC. Para analizar la posible interacción de *SHL* con la ruta del fotoperiodo hemos generado dobles mutantes que combinan *shl-2* con mutaciones como *co-2* y *gi-3*. Estos dobles mutantes se analizaron en condiciones de DL, en las que la ruta de fotoperiodo está activa. El mutante sencillo *shl-2* muestra un fenotipo de floración temprana en DL, mientras que los mutantes sencillos *co* y *gi* muestran un retraso en la floración en esta condición de fotoperiodo. Los dobles mutantes *shl-2 co* y *shl-2 gi-3* muestran un fenotipo aditivo ya que ambos florecen con un número de hojas intermedio entre el parental tardío y el parental temprano (Fig. 21). Esto indica que, al igual que ocurría con *EBS* (Piñeiro et al., 2003) no existe una interacción genética entre *SHL* y la ruta de fotoperiodo, a la que pertenecen *CO* y *GI*.

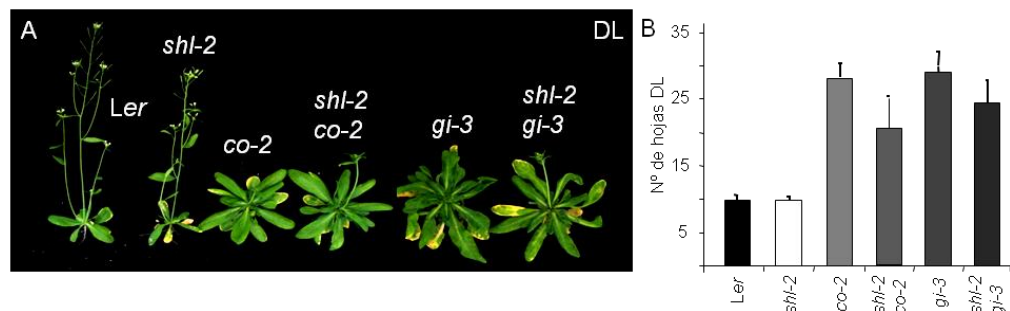


Fig. 21. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shl-2* con mutantes representativos de la ruta del fotoperiodo. A. Fenotipo de floración de plantas *Ler*, *shl-2*, *co-2*, *gi-3*, *shl-2 co-2* y *shl-2 gi-3* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DL.

2.6.2.2 Interacción de *SHL* con la ruta autónoma.

También hemos generado los dobles mutantes de *shl-2* con mutantes representativos de la ruta autónoma como son *fve-1* y *fca-1*. Los mutantes de la ruta autónoma presentan un fenotipo de floración tardía en DL y también en DC debido a los altos niveles de *FLC* que se acumulan en los mutantes afectados en genes de dicha ruta. Para analizar la posible interacción de *SHL* con la ruta autónoma, se analizó el tiempo de floración de los dobles mutantes *shl-2 fve-1* y *shl-2 fca-1* en ambas condiciones de fotoperiodo. En DL las mutaciones

fve-1 y *fca-1* provocan un retraso considerable en el tiempo de floración del mutante *shl-2*, de manera que los dobles mutantes muestran fenotipos de tiempo de floración más próximos al de los parentales tardíos que a *shl-2*, aunque no iguales, indicando que estas mutaciones de la ruta autónoma no suprimen totalmente el fenotipo temprano de los mutantes *shl-2*. Esto sugiere que *SHL* no interacciona de una forma directa con los genes de la ruta autónoma en DL (Fig. 22 A y B). Estos datos de tiempo de floración son similares a los obtenidos previamente para *EBS*, ya que el tiempo de floración de los dobles mutantes entre *ebs* y mutantes representativos de la ruta autónoma es aditivo en condiciones de DL, indicando que *EBS* no interacciona con la ruta autónoma en el control de la floración en *Arabidopsis* (Piñeiro et al., 2003).

En condiciones de DC las plantas *shl-2 fve-1* muestran un comportamiento similar al observado en DL para este doble mutante, y presentan un fenotipo de floración significativamente más temprano que *fve-1*, aunque próximo a éste. Estos resultados sugieren nuevamente que *SHL* no interacciona directamente con la ruta en la que participa *FVE*. En cambio, el tiempo de floración del doble mutante *shl-2 fca-1* no difiere significativamente del de *fca-1*, indicando que las mutaciones en este locus suprimen el fenotipo de floración temprano de *shl-2*. Estos resultados podrían sugerir la existencia de una interacción genética entre *SHL* y la ruta de la que forma parte *FCA*; sin embargo, no podemos descartar que los altos niveles del represor floral *FLC* presentes en mutantes de la ruta autónoma enmascaren el efecto que tiene la pérdida de función de *SHL* sobre el tiempo de floración de *Arabidopsis*.

La relación genética observada entre *SHL* y los genes de la ruta autónoma analizados difiere de la descrita previamente para *EBS*. Las mutaciones que afectan a *FVE* y *FCA* provocan un retraso de la floración considerablemente mayor en un fondo genético *shl-2* que en combinación con mutantes *ebs*, ya que los dobles mutantes *ebs fve-1* y *ebs fca-1* tienen un tiempo de floración prácticamente intermedio entre sus parentales respectivos (Gómez-Mena et al., 2001).

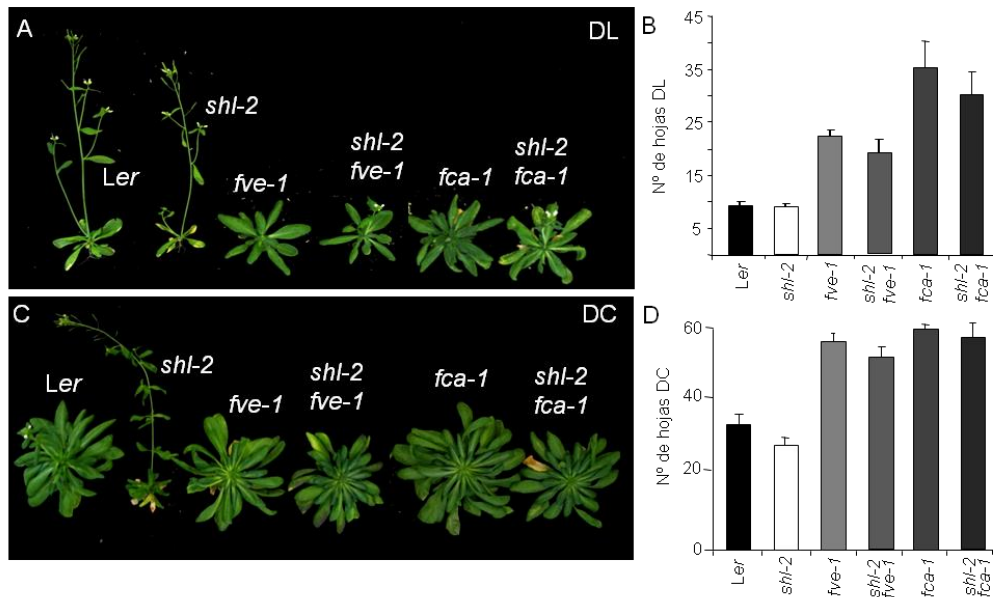


Fig. 22. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shl-2* con mutantes representativos de la ruta autónoma. A. Fenotipo de floración de plantas *Ler*, *shl-2*, *fve-1*, *shl-2 fve-1*, *fca-1* y *shl-2 fca-1* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DL. C. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *fve-1*, *shl-2 fve-1*, *fca-1* y *shl-2 fca-1* cultivadas en condiciones de DC. D. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DC.

2.6.2.3 Interacción de *SHL* con la ruta de las giberelinas.

Las giberelinas desempeñan un papel central en la inducción de la floración en *Arabidopsis*, especialmente en condiciones de DC. Por ese motivo, decidimos analizar la posible interacción del locus *SHL* con la ruta mediada por estas hormonas en la regulación del tiempo de floración. Para ello hemos generado y caracterizado los dobles mutantes de *shl-2* con mutantes afectados en la ruta de síntesis de estas hormonas, en concreto, *shl-2 ga1-3* y *shl-2 ga2-1*. El mutante *ga1-3* carece totalmente de giberelinas, y muestra un retraso moderado de la floración en condiciones de DL, siendo incapaz de florecer en condiciones no inductivas de DC (Wilson et al., 2004; Reeves y Coupland, 2001). Como se puede observar en la figura 23 B y C, el doble mutante *shl-2 ga1-3* muestra el mismo retraso en floración que *ga1-3* en condiciones de DL, mientras que en DC ambos tipos de plantas llegan a producir más de cien hojas de roseta sin que se inicie la floración. Puesto que las giberelinas son esenciales para la floración en DC, la ausencia total de estas hormonas en el mutante *ga1-3* podría enmascarar la relación genética existente entre *SHL* y la ruta de inducción de la floración dependiente de giberelinas. Por ello analizamos el fenotipo de floración de los dobles mutantes *shl-2 ga2-1*, en condiciones de DL y DC. A diferencia de lo observado para los dobles mutantes *shl-2 ga1-3*, las plantas *shl-2 ga2-1* presentan un tiempo de floración intermedio entre los dos parentales en

cualquier condición de fotoperiodo (Fig. 23 A-D), lo que sugiere que *SHL* no interacciona con la ruta de floración mediada por las giberelinas.

Estas observaciones contrastan con los resultados obtenidos previamente para *EBS*, ya que las mutaciones que afectan a enzimas de la biosíntesis de GAs suprimen totalmente la aceleración de la floración observada en los mutantes *ews* (Gómez-Mena et al., 2001), indicando que el fenotipo temprano de los mutantes *ews* requiere de una correcta biosíntesis de GAs. Por lo tanto, mientras que *SHL* no interacciona genéticamente con la ruta de inducción de la floración dependiente de GAs, el fenotipo de los mutantes afectados en la síntesis de estas hormonas es epistático sobre *ews* con respecto al tiempo de floración (Gómez-Mena et al., 2001). La diferencia en la interacción que muestran *SHL* y *EBS* con la ruta de floración dependiente de GAs apoyaría que ambos loci desempeñen funciones independientes en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*.

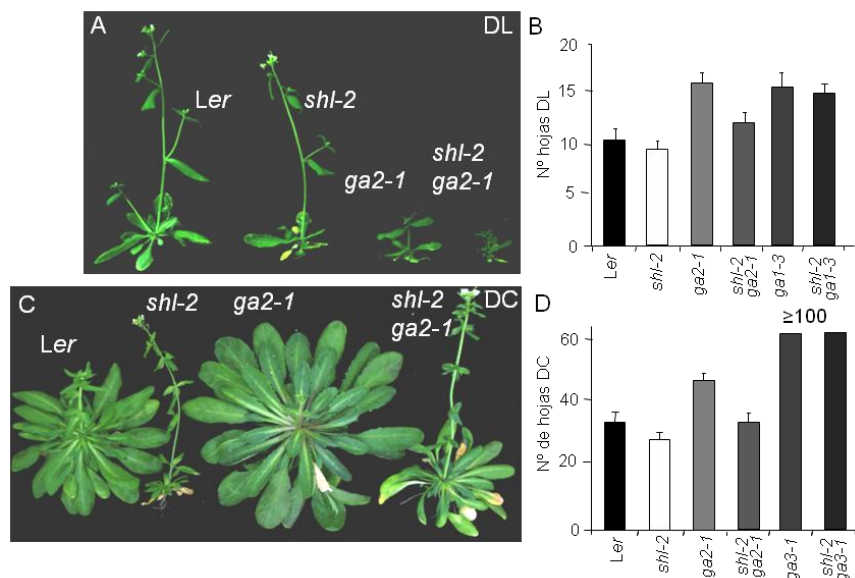


Fig. 23. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shl-2* con mutantes representativos de la ruta de las giberelinas. A. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *ga2-1*, y *shl-2 ga2-1* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles mostrados en A, y de *ga1-3* y *shl-2 ga1-3* en condiciones de DL. C. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *ga2-1*, y *shl-2 ga2-1* cultivadas en condiciones de DC. D. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DC.

2.6.3 Interacción de *SHL* con los integradores florales *FT* y *SOC1*.

FT y *SOC1* son genes maestros encargados de integrar la información procedente de las distintas rutas que controlan el tiempo de floración en *Arabidopsis* y, una vez que la planta se encuentra en condiciones óptimas para florecer, activar la expresión de los genes de identidad de meristemo floral. Estos a su vez activarán los genes de identidad de órgano floral, encargados de dirigir el desarrollo de flores e inflorescencias.

2.6.3.1 Interacción de *SHL* con los integradores florales *FT* y *SOC1* en condiciones de DL.

Resultados obtenidos previamente en nuestro grupo demostraron que el fenotipo de floración temprana de los mutantes *ebs*, requiere de un gen *FT* funcional ya que el doble mutante *ebs ft-1* florece con el mismo número de hojas que el mutante *ft-1* (Piñeiro et al., 2003). Puesto que *SHL* parece tener funciones al menos parcialmente redundantes con *EBS*, decidimos analizar la posible interacción genética entre *SHL* y *FT*. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con los mutantes *ebs*, el doble mutante *shl-2 ft-1* muestra en DL un tiempo de floración intermedio entre los mutantes sencillos *shl-2* y *ft-1*, lo que indica que, al contrario de lo que ocurre con *EBS*, no existe una interacción genética entre *SHL* y *FT*, (Fig. 24).

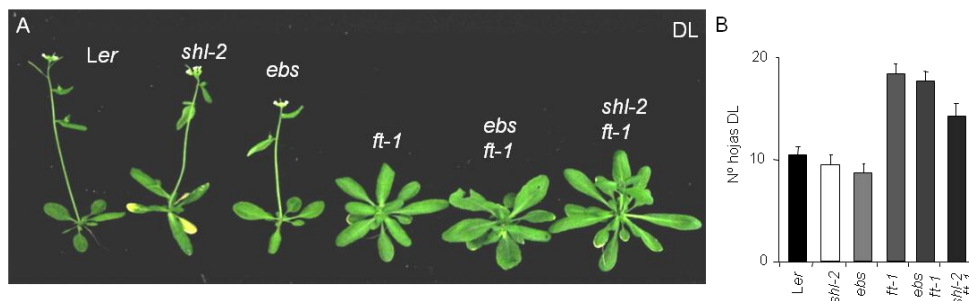


Fig. 24. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shl-2* y *ebs* con el mutante *ft-1*. A. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *ebs*, *ft-1*, *ebs ft-1* y *shl-2 ft-1* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DL.

Con el fin de establecer si existe una relación genética entre *SHL* y otro de los integradores florales, *SOC1*, analizamos el tiempo de floración del doble mutante *shl-2 soc1-1*; en este caso sí se observa una clara relación de epistasia entre los mutantes *shl-2* y el mutante *soc1-1* ya que el doble mutante *shl-2 soc1-1* florece con el mismo número de hojas que el mutante *soc1-1* en condiciones fotoperiódicas inductivas de DL (Fig. 25). Por el contrario, y de acuerdo con datos publicados anteriormente, el doble mutante *ebs soc1-1* presenta un tiempo

de floración intermedio entre los dos mutantes parentales, lo que confirma los datos anteriores que indicaron la ausencia de interacción genética entre *EBS* y *SOC1* (Gómez-Mena et al., 2001).

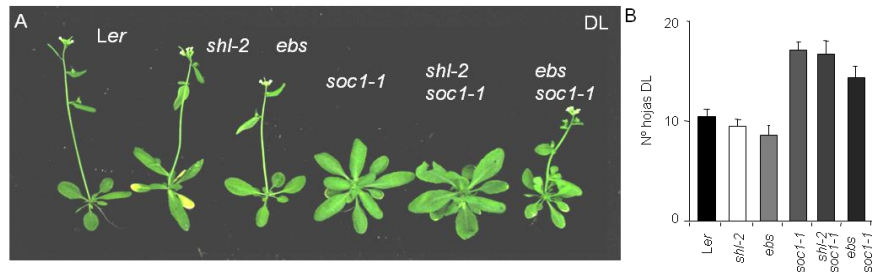


Fig. 25. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shl-2* y *ebs* con el mutante *soc1-1*.
 A. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *ebs*, *soc1-1*, *shl-2 soc1-1* y *ebs soc1-1* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DL.

2.6.3.2 Interacción de *SHL* con *FT* y *SOC1* en condiciones de DC.

También cuantificamos el tiempo de floración de los dobles mutantes *shl-2 ft-1* y *shl-2 soc1-1* en condiciones fotoperiódicas no inductivas. Tal y como sucede en condiciones de DL, el doble mutante *shl-2 ft-1* florece en DC con un número de hojas intermedio entre los dos parentales *shl-2* y *ft-1*, mientras que el doble mutante *shl-2 soc1-1* florece al mismo tiempo que el mutante sencillo *soc1-1* (Fig. 26). Por lo tanto, las observaciones en DC confirman que las mutaciones en *SOC1*, pero no en *FT*, suprimen totalmente el fenotipo de floración temprana de los mutantes *shl-2*, e indican que el integrador floral *SOC1* es epistático sobre *SHL*. Así pues, de las mutaciones de tiempo de floración analizadas, únicamente las que afectan a *SOC1* eliminan totalmente el fenotipo temprano de *shl-2* tanto en DL como en DC, indicando que este integrador floral es necesario para la floración prematura de los mutantes *shl-2*.

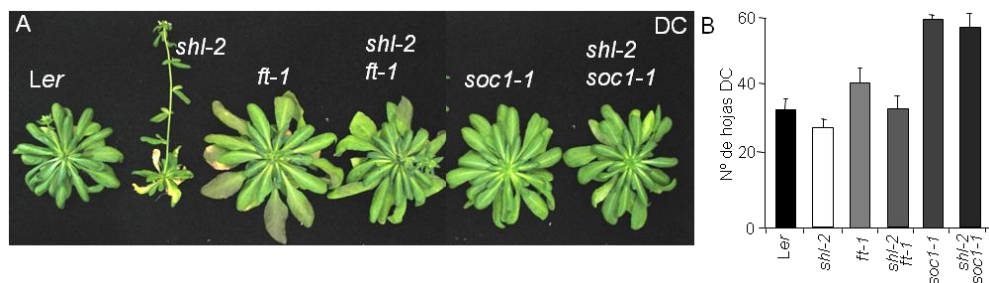


Fig. 26. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shl-2* con los mutantes *ft-1* y *soc1-1*.
 A. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *ft-1*, *soc1-1*, *shl-2 ft-1* y *shl-2 soc1-1* cultivadas en condiciones de DC. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y dobles en condiciones de DC.

Los datos obtenidos del análisis genético presentado muestran que *SHL* y *EBS* interactúan de manera diferente con las rutas de inducción de la floración analizadas así como con los integradores florales *FT* y *SOC1*, ya que *EBS* interactúa con el integrador floral *FT* y *SHL* lo hace con *SOC1*. Estas observaciones son consistentes con que ambos loci tengan funciones independientes en el control del tiempo de floración.

2.6.3.3 Análisis del tiempo de floración de los triples mutantes *ebs shl-2 ft-1* y *ebs shl-2 soc1-1*.

Para profundizar en el análisis de la interacción de *EBS* y *SHL* con los integradores florales, hemos generado y analizado plantas triples mutantes *ebs shl-2 ft-1* y *ebs shl-2 soc1-1*. Para construir el triple mutante *ebs shl-2 ft-1*, cruzamos una planta doble mutante *ebs shl-2* por el mutante sencillo *ft-1*. Esta estrategia facilitó la obtención del triple mutante, ya que *EBS* y *SHL* están situados en el cromosoma IV. Como se observa en la figura 27, tanto en condiciones de DL como de DC el tiempo de floración del triple mutante *ebs shl-2 ft-1* es intermedio entre el de *ebs shl-2* y el de *ft-1*, indicando que la falta de función del integrador floral *FT* no es suficiente para suprimir completamente el fenotipo de floración temprana del doble mutante *ebs shl-2*.

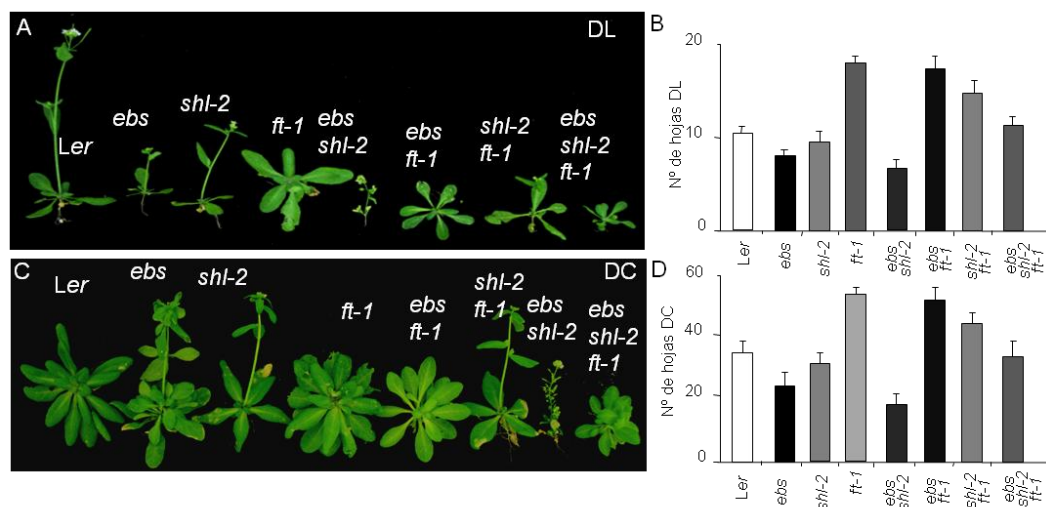


Fig. 27. Fenotipo de floración del triple mutante *ebs shl-2 ft-1*. A. Fenotipo de las plantas *Ler*, *ebs*, *shl-2*, *ft-1*, *ebs shl-2*, *ebs ft-1*, *shl-2 ft-1* y *ebs shl-2 ft-1* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos, dobles y triple mutante en condiciones de DL. C. Fenotipo de las plantas *Ler*, *ebs*, *shl-2*, *ft-1*, *ebs ft-1*, *shl-2 ft-1*, *ebs shl-2* y *ebs shl-2 ft-1* cultivadas en condiciones de DC. D. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos, dobles y triple mutante en condiciones de DC.

Asimismo generamos el triple mutante *ebs shl-2 soc1-1* y se cuantificó el tiempo de floración tanto en DL como en DC. Como se observa en la figura 28, el triple mutante presenta un tiempo de floración intermedio entre el mutante sencillo *soc1-1* y el doble mutante *ebs shl-*

2. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos en el análisis de dobles mutantes y nos permiten concluir que, las mutaciones en cada uno de los integradores florales *FT* y *SOC1* no son capaces de suprimir totalmente el fenotipo de floración temprana del doble mutante *ebs shl-2*. Experimentos futuros permitirán establecer si la falta de función de ambos integradores florales es capaz de suprimir totalmente el fenotipo de floración temprana de plantas *ebs shl-2*.



Fig. 28. Fenotipo de floración del triple mutante *ebs shl-2 soc1-1*. A. Fenotipo de las plantas *Ler*, *ebs*, *shl-2*, *soc1-1*, *ebs shl-2*, *ebs soc1-1*, *shl-2 soc1-1* y *ebs shl-2 soc1-1* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos, dobles y triple mutante en condiciones de DL. C. Fenotipo de las plantas *Ler*, *ebs*, *shl-2*, *soc1-1*, *ebs shl-2*, *ebs soc1-1*, *shl-2 soc1-1* y *ebs shl-2 soc1-1* cultivadas en condiciones de DC. D. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos, dobles y triple mutante en condiciones de DC.

2.6.4 Interacción de *SHL* con los genes de identidad del meristemo floral *LFY* y *AP1*.

EBS participa en la regulación de otros procesos del desarrollo, además del tiempo de floración. Las mutaciones *ebs* provocan un incremento en la expresión de los genes homeóticos florales *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) y *AG* y son capaces de rescatar parcialmente el fenotipo floral de los mutantes *lfy-6*, indicando que *EBS* es necesario para la correcta especificación de órganos florales en *Arabidopsis* (Gómez-Mena et al., 2001). Con el fin de comprobar si *SHL* también desempeña un papel en este proceso, generamos los dobles mutantes entre *shl-2* y los mutantes *lfy-5* y *ap1-1*. El alelo *lfy-5* presenta una especificación errónea de la identidad del meristemo floral, principalmente en las primeras flores, que poseen menos pétalos, estambres y a menudo aparecen flores secundarias en el interior de la flor principal (Weigel et al., 1992). El análisis del doble mutante *shl-2 lfy-5* reveló una

morfología floral similar a la del mutante *lfy-5* (datos no mostrados) sin que se aprecien diferencias significativas en el número de órganos florales entre ambos genotipos, indicando que la mutación *shl-2* no afecta al fenotipo floral de *lfy-5*. Asimismo, analizamos el tiempo de floración de estas plantas en condiciones de DL; y el fenotipo de floración del doble mutante *shl-2 lfy-5* no muestra variaciones significativas con el tiempo de floración del mutante sencillo *shl-2* (datos no mostrados) indicando que la mutación *lfy-5* tampoco afecta al fenotipo de tiempo de floración de *shl-2*.

De la misma manera, los análisis realizados con el doble mutante *shl-2 ap1-1* muestran que la morfología floral y de la inflorescencia son similares a la del mutante *ap1-1* (Fig. 29 A). Las flores de ambos tipos de plantas carecen de pétalos y sépalos, y la inflorescencia está formada exclusivamente por hojas, estambres, y carpelos (Fig. 29 A). Además, hemos analizado el tiempo de floración de estas plantas dobles mutantes en condiciones de DL; de acuerdo con observaciones previas, el mutante *ap1-1* no presenta alteraciones que afecten al momento en que tiene lugar la transición floral. En cambio, el doble mutante *shl-2 ap1-1* florece con un número de hojas muy similar al de *shl-2*, indicando que la mutación *ap1-1* no modifica el tiempo de floración del mutante *shl-2*. Por lo tanto, el análisis del doble mutante *shl-2 ap1-1* reveló una morfología floral y de la inflorescencia similar a la del mutante *ap1-1* (Fig. 29 A), si bien la morfología de las hojas y el tiempo de floración fueron idénticos a los del mutante *shl-2* (Fig 29). Así pues, tal como ocurría con el doble mutante *shl-2 lfy-5*, el doble mutante *shl-2 ap1-1* presenta los fenotipos característicos de cada una de las mutaciones parentales con respecto al tiempo de floración y a la especificación de órganos florales. Puesto que las mutaciones en *SHL* no alteran significativamente el fenotipo floral de los mutantes *lfy-5* y *ap1-1* se podría concluir que ambos genes no interaccionan con *SHL* en la especificación del meristemo floral. Estas observaciones y la ausencia de alteraciones en la especificación de órganos florales en los mutantes *shl-2* sugieren que *SHL* no tendría una función en la determinación de la identidad del meristemo floral. Sin embargo, este análisis no nos permite descartar que *SHL* desempeñe funciones redundantes con las de *EBS* en este proceso, y que sólo se desvelaran en ausencia de un gen *EBS* funcional.

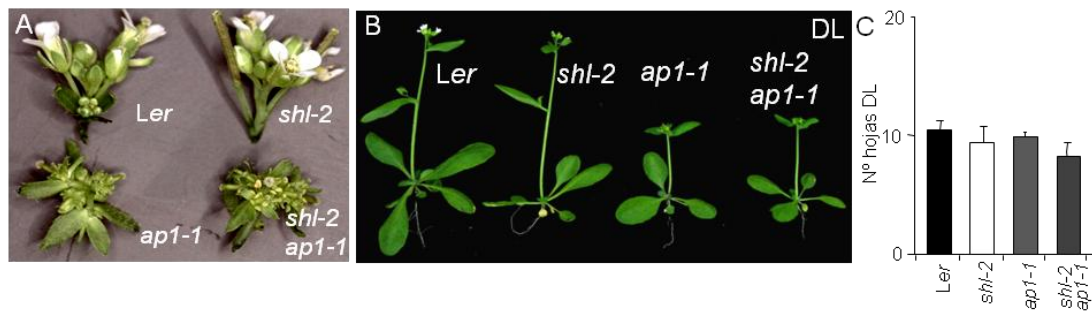


Fig. 29. Fenotipo de floración del doble mutante *shl-2 ap1-1*. A. Detalle de la inflorescencia de *Ler*, *shl-2*, *ap1-1* y *shl-2ap1-1*. B. Fenotipo de floración de las plantas *Ler*, *shl-2*, *ap1-1* y *shl-2 ap1-1* cultivadas en condiciones de DL. C. Cuantificación del tiempo de floración del doble y los simples mutantes en condiciones de DL.

3. Papel de *SHL* en la regulación de genes reguladores del tiempo de floración.

SHL codifica una proteína nuclear con un dominio BAH y un dominio PHD. Ambos motivos se han descrito en reguladores transcripcionales que formarían parte de complejos que remodelan cromatina. Además, EBS, con la misma arquitectura modular que *SHL*, está implicado en la represión del integrador floral *FT* y de genes de identidad de órgano floral (Piñeiro et al., 2003). Estas observaciones sugieren que *SHL* podría participar también en el control de la expresión génica y estar implicado en la regulación de la transición floral en *Arabidopsis*, modulando la transcripción de genes de tiempo de floración. Con el fin de comprobar esta hipótesis, analizamos el efecto de la mutación *shl-2* sobre la expresión de genes representativos de las distintas rutas que controlan la inducción floral así como la expresión de los integradores florales, comparándolo con el ecotipo silvestre *Ler* y también con los mutantes *ebs*.

3.1 Análisis de la expresión del gen *CO* en los mutantes *shl-2*.

CO activa la expresión de *FT* en la hoja en condiciones de DL (Suárez-López et al., 2001; Yanovsky y Kay, 2002; Hayama y Coupland, 2003), y se ha propuesto que la proteína *FT* puede desplazarse a través del floema hasta el meristemo apical donde induce la expresión de *SOC1* y *AP1* (Coupland et al. 2007). *CO* por lo tanto, desempeña un papel esencial en la respuesta fotoperiódica de la floración y su patrón de expresión diario con un pico alrededor de 12 horas después del amanecer (Suarez-Lopez et al., 2001) es esencial para dicha respuesta. Para establecer si *SHL* está implicado en la regulación transcripcional de *CO*, analizamos su expresión en plántulas de *Arabidopsis* recogidas tras distintos días de cultivo en DC,

condiciones en las que el fenotipo de floración del mutante *shl-2* se observa con mayor claridad. Como se observa en la figura 30, los resultados obtenidos muestran que la expresión de *CO* a lo largo de distintos días del desarrollo, no se encuentra alterada significativamente en los mutantes *shl-2*. De acuerdo con resultados previos (Piñeiro et al., 2003), la mutación *ebs* tampoco afecta significativamente a los niveles de expresión de *CO*.

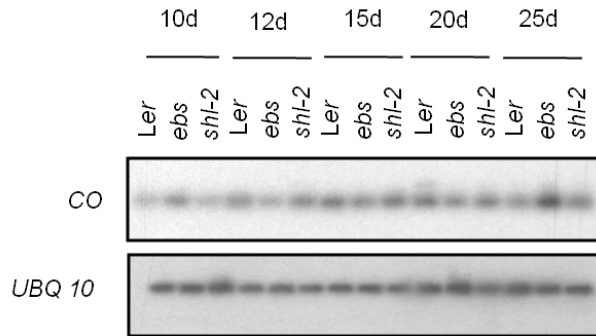


Fig. 30. Análisis de la expresión del gen *CO* en los mutantes *ebs* y *shl-2*. RT-PCR con plántulas de 15 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día (8 horas tras amanecer). Como control de carga se usa el gen constitutivo *UBQ 10*.

Puesto que el mensajero de *CO* muestra una oscilación diaria, decidimos analizar su expresión en el mutante *shl-2* a lo largo de un ciclo de 24 horas. Para ello, cada 4 horas recogimos muestras de plantas *Ler*, *shl-2* y *ebs* nuevamente cultivadas en condiciones de DC. Como se puede comprobar en la figura 31, el perfil de expresión de *CO* en *Ler* es idéntico al descrito previamente (Suárez-López et al., 2001), mostrando niveles muy bajos durante el periodo de iluminación (0-8 h) y un pico de acumulación del RNAm durante el periodo de oscuridad. Asimismo, se observa que el patrón obtenido en el mutante *shl-2* no difiere significativamente del de la planta silvestre. De acuerdo con observaciones previas (Piñeiro et al., 2003), el perfil observado para el mutante *ebs* es idéntico a los anteriores. Estas observaciones nos permiten concluir que *SHL* no estaría implicado en la regulación transcripcional de *CO* en DC, y son consistentes con los resultados obtenidos en los análisis genéticos descritos previamente que sugerían que *SHL* no participaría en la ruta de fotoperiodo.

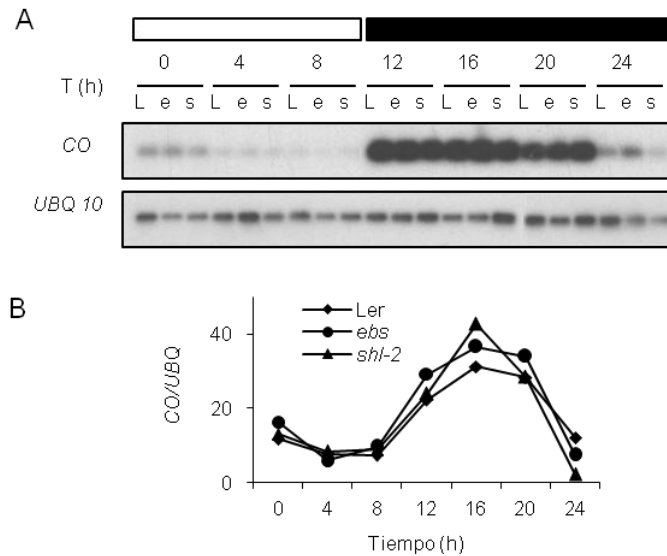


Fig. 31. Análisis de la expresión de CO en los mutantes *shl-2* a lo largo del día. A. RT-PCR con plántulas de los ecotipos *Ler* (L), *ebs* (e) y *shl-2* (s) de 14 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas cada 4 horas durante 24 horas. La hora 0 corresponde al inicio del periodo de iluminación. Como control de carga se usa el gen constitutivo *UBQ 10*. B. Cuantificación de los niveles relativos de expresión de *CO*. Los valores se relativizan frente al gen constitutivo *UBQ 10* y se le otorga el valor 1 al valor más bajo.

3.2 Análisis de la expresión de *FVE*, *FLC* y genes *FLC*-LIKE en mutantes *shl-2*.

Los dobles mutantes que combinan *shl-2* con mutaciones que afectan a genes de la ruta autónoma mostraron un tiempo de floración muy próximo al de los respectivos parentales tardíos, *fve-1* y *fca-1* (Fig. 22), lo que podría sugerir la existencia de algún tipo de interacción genética entre *SHL* y la ruta autónoma en el control del tiempo de floración. Por ese motivo decidimos analizar los niveles de expresión de *FVE* en mutantes *shl-2*. Como se observa en la figura 32 A, los niveles de expresión de este gen perteneciente a la ruta autónoma no muestran alteraciones significativas en los mutantes *shl-2* con respecto al ecotipo silvestre *Ler*; asimismo, los niveles del RNAm de *FVE* en mutantes *ebs* son también similares.

La ruta autónoma induce el inicio de la floración reprimiendo la expresión de *FLC* (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999; Simpson et al., 2004), que a su vez, reprime la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC 1*. Por tanto, los niveles de expresión de este represor floral son determinantes para establecer el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Por ello decidimos comprobar si *SHL* está implicado en regular los niveles de *FLC*. Puesto que en plantas de la accesión *Ler* los niveles de este gen son muy bajos, se decidió llevar a cabo este experimento en un fondo genético *fve-1* donde los niveles de *FLC* son más altos y detectables mediante experimentos de northern blot. De acuerdo con lo esperado, no se detecta el

mensajero de *FLC* en plantas *Ler* y mutantes *shl-2*, pero sí en plantas *fve-1* (Fig. 32 B). Además, se observa que la expresión de *FLC* en los mutantes sencillos *fve-1* y en los dobles mutantes *shl-2 fve-1* es similar, lo que indica que *SHL* no participaría en la regulación de la expresión de este represor floral. Resultados similares fueron obtenidos cuando estudiamos la expresión de *FLC* en mutantes *shl-2* y *ebs* mediante experimentos de RT-PCR (Fig. 32 C).

Además de *FLC*, otros genes parálogos de éste tales como *MAF1/FLM* y los genes *MAF2-MAF5* también participan en el control de la floración en respuesta a la vernalización y en otros aspectos de la regulación del tiempo de floración (Ratcliffe et al., 2001; Ratcliffe et al., 2003). El hecho de no haber observado relación genética entre *SHL* y los genes de la ruta autónoma *FVE* y *FCA*, ó el no haber detectado cambios en la expresión de *FLC* en el mutante *shl-2*, no nos permite descartar que *SHL* esté implicado en la regulación de los genes *MAF*. Por ello, analizamos la expresión de estos genes en los mutantes *ebs* y *shl-2* y se comprobó que ninguno de los dos mutantes muestran variaciones significativas en la expresión de dichos genes en comparación con el ecotipo silvestre *Ler* (Fig. 32C). Por todo ello concluimos que *SHL* no participa en la regulación de la expresión de los genes de la ruta autónoma, del represor floral *FLC* o de genes de la familia *MAF*.

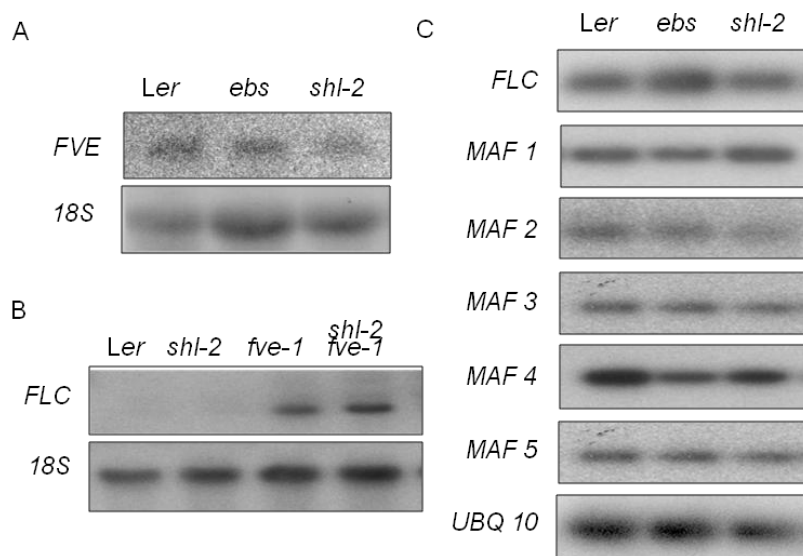


Fig. 32. Análisis de la expresión de los genes *FVE*, *FLC*, y *FLC-LIKE (MAF)* en mutantes *shl-2*. A. Análisis de la expresión del gen *FVE* en los mutantes *ebs* y *shl-2*. B. Análisis de la expresión del gen *FLC* en los mutantes sencillos *shl-2*, *fve-1* y en el doble mutante *shl-2 fve-1*. Como control de carga interno se utiliza el gen del RNA ribosomal *18S*. C. RT-PCR en la que se analiza la expresión del gen *FLC* y de los genes *FLC-like* en los mutantes *ebs* y *shl-2*. Como control de carga interno se usa el gen constitutivo *UBQ 10*. Los tres experimentos se realizaron con plántulas de 14 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día.

3.3 Análisis de la expresión del gen *GA5* en los mutantes *shl-2*.

Las giberelinas (GAs) son un tipo de hormonas que afectan a diversos aspectos del desarrollo vegetal (Schwechheimer, 2008) y promueven la floración en varias plantas de DL (Zeevaart, 1983; Bernier, 1988; Putterill et al., 1995), incluida *Arabidopsis* (Langridge, 1957; Chandler y Dean, 1994) donde desempeñan un papel esencial en la inducción de la floración en fotoperiodos no inductivos. Puesto que el fenotipo de floración temprana de los mutantes *shl-2* es más patente en condiciones de DC, decidimos analizar si *SHL* podría estar implicado en regular la síntesis o modular los niveles de estas hormonas. El gen *GA5* codifica un enzima clave en la regulación de la biosíntesis de GAs, la GA 20-oxidasa, porque los cambios en los niveles de esta hormona afectan a la expresión de este locus (Xu et al., 1995). Por ello analizamos si la expresión de *GA5* estaba afectada en mutantes *shl-2*. Como se muestra en la figura 33 no se observan cambios en la expresión de dicho gen en plántulas de mutantes *shl-2* cultivadas en DC; de forma similar y de acuerdo con datos previos (Piñeiro et al., 2003), la mutación *ebs* tampoco afecta a la expresión de *GA5*. Estos datos sugieren que a pesar de regular el inicio de la floración en DC, *SHL* no participa en el control de la síntesis de GAs. Estas observaciones son consistentes con los datos genéticos discutidos anteriormente que indicaban una ausencia de interacción genética entre el locus *SHL* y la ruta de inducción de la floración dependiente de GAs.

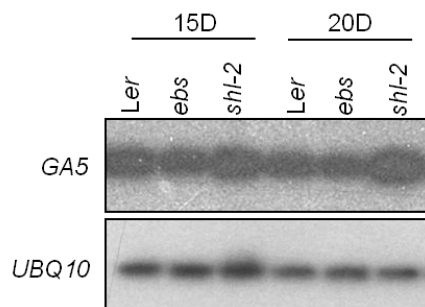


Fig. 33. Análisis de la expresión del gen *GA5* en los mutantes *ebs* y *shl-2*. A. RT-PCR con plántulas de 15 y 20 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día. Como control de carga se usa el gen constitutivo *UBQ10*.

3.4 Análisis de la expresión del gen *FT* en los mutantes *shl-2*.

Como ya se discutió anteriormente, las rutas inductoras de la floración en *Arabidopsis*, convergen a nivel del integrador floral *FT*, activando su expresión. Además, varios represores transcripcionales participan en la regulación de *FT*, entre ellos *EBS*, que es necesario para reprimir la expresión de *FT* principalmente en condiciones no inductivas de DC (Piñeiro et al., 2003). Con el fin de establecer si, al igual que *EBS*, *SHL* también regula la expresión de *FT* realizamos experimentos de RT-PCR con RNAm de plántulas cultivadas en condiciones de DC y recogidas 8 horas después de iniciarse el periodo de iluminación diario. Tal y como se puede observar en la figura 34 y de acuerdo con nuestros datos anteriores, la expresión de *FT* está aumentada en los mutantes *ebs* a partir del día 12, mientras que no se detectan cambios en la expresión de *FT* en los mutantes *shl-2*. La expresión de *FT*, muestra una oscilación diaria que es esencial para su función en la inducción floral (Suárez-López et al., 2001). Por ello, se analizaron los niveles de expresión de *FT* a lo largo de un ciclo completo de 24 horas. Se emplearon para ello, plántulas cultivadas durante 14 días en condiciones de DC tomando muestras cada 4 horas (Fig. 35). Nuevamente, los niveles de *FT* no sufren alteraciones significativas en los mutantes *shl-2*, pero sí en los mutantes *ebs* (Fig. 35). Por lo tanto, estos resultados sugieren que, a diferencia de *EBS*, la pérdida de función de *SHL* no tiene consecuencias sobre la regulación transcripcional del integrador floral *FT*.

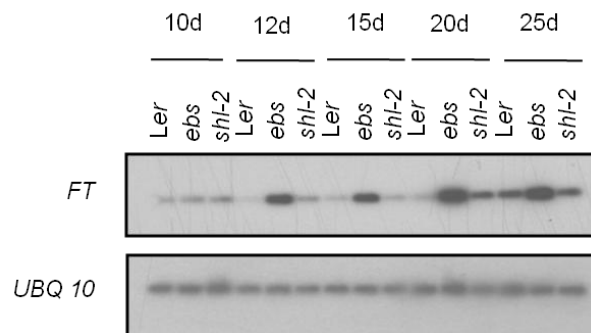


Fig. 34. Análisis de la expresión del locus *FT* en los mutantes *ebs* y *shl-2*. A. RT-PCR con plántulas de 10, 12, 15, 20 y 25 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día. Como control de carga se usa el gen constitutivo *UBQ 10*.

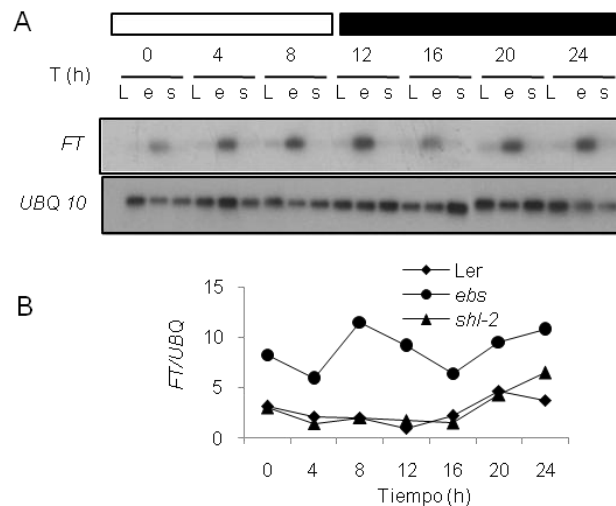


Fig. 35. Análisis de la expresión de *FT* en los mutantes *shl-2* a lo largo del día. A. RT-PCR con plántulas de los ecotipos *Ler* (L), *ebs* (e) y *shl-2* (s) de 14 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas cada 4 horas durante 24 horas. La hora 0 corresponde al inicio del periodo de iluminación. Como control de carga se usa el gen constitutivo *UBQ 10*. B. Cuantificación de los niveles relativos de expresión de *FT* relativizados como en la figura 31.

3.5 Análisis de la expresión del gen *TSF* en los mutantes *shl-2*.

Las vías que controlan la transición floral en *Arabidopsis* se integran principalmente a nivel de *FT* y *SOC1*. Sin embargo, genes homólogos a *FT*, como *TSF*, comparten funciones con este integrador floral (Michaels et al., 2005; Yamaguchi et al. 2005). Al igual que *FT*, *TSF* se induce rápidamente por *CO* (Yamaguchi et al. 2005). Además, los niveles de expresión de *FT* y *TSF* a lo largo del día, muestran patrones similares de oscilación diurna, con un pico de expresión por la tarde, mayores niveles de expresión en condiciones de DL que en DC y un incremento inmediato de la expresión cuando aumenta la duración de los días (Yamaguchi et al. 2005).

Para establecer si *SHL* participa en la regulación de *TSF*, analizamos los niveles de expresión de este locus en los mutantes *shl-2*. Tal y como se observa en la figura 36, los niveles de expresión de *TSF* no se encuentran alterados en los mutantes *shl-2*, por lo que se puede concluir que *SHL* no regula ni la expresión de *FT* ni la de *TSF*, mientras que *EBS* actúa reprimiendo la expresión de *FT* (Gómez-Mena et al., 2001) pero no regula la de su homólogo *TSF*.

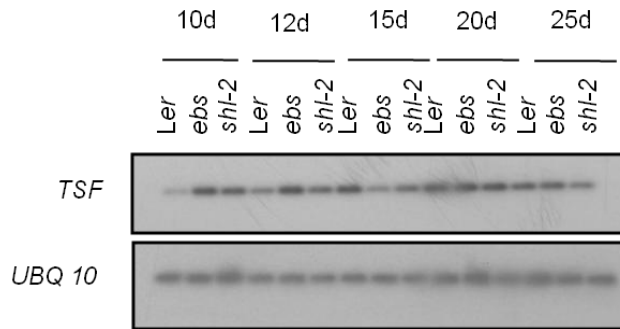


Fig. 36. Análisis de la expresión de *TSF* en los mutantes *ebs* y *shi-2*. A. RT-PCR con plántulas de 10, 12, 15, 20 y 25 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día. Como control de carga interno se usa el gen constitutivo *UBQ 10*.

3.6 Análisis de la expresión de *SOC1* en los mutantes *shi-2*.

Dado que el análisis del doble mutante *shi-2 soc1-1* indica que el fenotipo temprano del mutante *shi-2* requiere de la actividad del integrador floral *SOC1*, analizamos los niveles de expresión de dicho integrador floral en los mutantes *shi-2* mediante experimentos de northern blot. Para ello se utilizaron plántulas de 18, 20 y 25 días del ecotipo silvestre *Ler* y de los mutantes *ebs* y *shi-2* cultivados en condiciones de DC. Como puede comprobarse en la figura 37, los niveles de expresión del integrador floral *SOC1* están elevados en los mutantes *shi-2* ya en el día 18, mientras que en los mutantes *ebs*, los niveles de *SOC1* empiezan a aumentar posteriormente, posiblemente como consecuencia del aumento de *FT* que se produce en estos mutantes desde estadios tempranos del desarrollo de la planta (Searle et al., 2006). Estos resultados indican que *SHL* es necesario para reprimir la expresión de *SOC1* en DC en estadios tempranos del desarrollo y son consistentes con el análisis genético presentado anteriormente que mostró una relación epistática de *SOC1* sobre *SHL*.

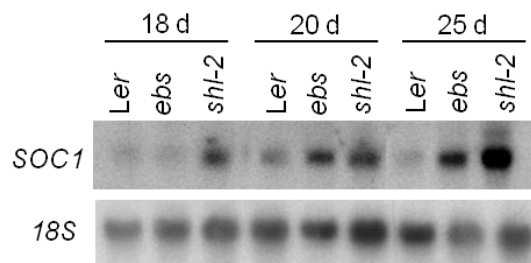


Fig. 37. Análisis de la expresión del gen *SOC1* en los mutantes *shi-2* y *ebs*. Northern blot con plántulas de 18, 20 y 25 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día. Como control de carga se utiliza el gen del RNA ribosomal 18S.

3.7 Análisis de la expresión de genes implicados en el control del tiempo de floración en los dobles mutantes *ebs shl-2*.

Para profundizar en el mecanismo por el cual *EBS* y *SHL* interactúan para modular la expresión de genes implicados en el control del tiempo de floración, y en particular de los integradores florales, se analizó también la expresión de *CO*, *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *ebs shl-2*. La figura 38 A muestra los resultados obtenidos comparando la expresión del doble mutante con el tipo silvestre y los dos mutantes sencillos, *ebs* y *shl-2*. La expresión de *CO* no muestra cambios significativos en los dobles mutantes *ebs shl-2* con respecto al ecotipo silvestre *Ler* y a cada uno de los mutantes sencillos (Fig. 38 A). En todos los casos, el mensajero de *CO* se mantiene bajo durante las primeras horas del día (0 horas) y empieza a aumentar durante el periodo de oscuridad (8 horas), de acuerdo con el patrón de oscilación diario esperado (Suárez-López et al., 2001).

En el caso del integrador floral *FT*, los dobles mutantes *ebs shl-2*, muestran un aumento de expresión mayor que el detectado en los mutantes sencillos *ebs*. Este aumento en la expresión de *FT* ocurre tanto en las muestras recogidas a primera hora de la mañana (0 horas) como a última hora del día (8 horas) en condiciones de DC (Fig. 38 A), y pondría de manifiesto un papel para *SHL* en la represión de *FT* en DC que sólo se desvela en ausencia de un locus *EBS* funcional. Esta observación está de acuerdo con los datos del análisis genético que revelaron la existencia de cierta redundancia funcional entre *EBS* y *SHL*.

Por último, al igual que en el caso de *FT*, la expresión de *SOC1* es mayor en los dobles mutantes *ebs shl-2* que en los mutantes sencillos *ebs* y *shl-2* tanto en las muestras recogidas a 0 horas como a 8 horas desde el comienzo del periodo de luz en condiciones de DC (Fig. 38 B). Nuevamente, estos datos de expresión sugieren que *EBS* podría reprimir a *SOC1* en ausencia de un gen *SHL* funcional, y son consistentes con la existencia de funciones parcialmente redundantes entre *EBS* y *SHL* en el control transcripcional de los integradores florales.

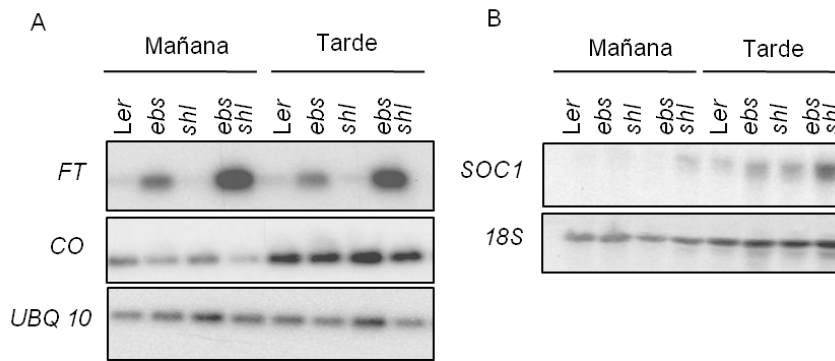


Fig. 38. Análisis de la expresión de los genes *FT*, *SOC1* y *CO* en los dobles mutantes *ebs shl-2*. A. RT-PCR con plántulas *Ler*, *ebs*, *shl-2* y *ebs shl-2* de 14 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a 0 horas y 8 horas tras el comienzo del periodo de iluminación. Como control de carga se utiliza el gen constitutivo *UBQ10*. B. Northern blot con plántulas *Ler*, *ebs*, *shl-2* y *ebs shl-2* de 18 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a primera y a última hora del día. Como control de carga se utiliza el gen del RNA ribosomal 18S.

4. Análisis de la posible interacción entre SHL y EBS con loci que codifican proteínas relacionadas con procesos de remodelación de cromatina.

Diversos trabajos han puesto de manifiesto el papel central que desempeñan los procesos de remodelación de la cromatina en el establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión génica que gobiernan el desarrollo de las plantas (revisado en Jarillo et al., 2009). A través del análisis de diferentes mutantes de floración temprana se han identificado proteínas que reprimen la transcripción de genes que promueven la floración y en muchos casos, estas proteínas están formando parte de complejos represores de la transcripción relacionados con la regulación de la estructura de la cromatina (Birve et al., 2001; Gaudin et al., 2001; Kinoshita et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Wagner y Meyerowitz, 2002; Kotake et al., 2003; Piñeiro et al., 2003; Farrona et al., 2008). La arquitectura funcional de EBS y SHL sugiere que podrían estar implicadas en la regulación de la expresión génica a través de cambios en la organización de la cromatina. Con el fin de determinar una posible relación funcional entre la represión de la transición floral ejercida por *EBS* y *SHL* y la mediada por otros loci implicados en la modulación de la dinámica estructural de la cromatina tales como *TFL2* y *CLF*, que también regulan la expresión del integrador floral *FT* (Jiang et al., 2008), hemos generado los dobles mutantes, *shl-2 clf-16*, *ebs clf-16*, *shl-2 tfl2-1* y *ebs tfl2-1*.

4.1 Interacción entre los loci *EBS* y *SHL* y *CLF*.

El complejo represor Polycomb (PRC2) está conservado en animales y en plantas; los complejos PRC2 y PRC2-like depositan la marca H3K27me3 sobre los genes diana reprimiendo su expresión (Kohler y Villar., 2008). En *Arabidopsis* se han encontrado homólogos del

complejo PRC2 que participan en la regulación de procesos del desarrollo como la inducción floral, formación de las flores, desarrollo de las semillas y desarrollo del esporofito (Pien y Grossniklaus, 2007). CLF forma parte de estos complejos y es la proteína con actividad metil transferasa de histonas que media la deposición de la señal H3K27me3 en la cromatina de los diferentes loci incluyendo *FLC*, *MAF4*, *MAF5*, *AG*, *SMT* y *FT*, y reprimiendo su expresión (Jiang et al., 2008). Las mutaciones en *CLF* causan floración temprana y una curvatura en las hojas debida a la expresión ectópica del gen homeótico *AG* a la que debe su nombre el mutante.

El fenotipo del doble mutante *shl-2 clf-16* muestra un fenotipo de floración muy similar al del mutante sencillo *clf-16*, lo que sugiere la existencia de una interacción genética entre ambos loci, y que *CLF* sería epistático sobre *SHL* para el fenotipo de tiempo de floración tanto en condiciones de DL como de DC, ya que en ausencia de la función de *CLF*, las mutaciones *shl-2* no tienen ningún efecto adicional sobre el tiempo de floración (Fig. 39). Además la planta doble mutante presenta una reducción en el tamaño de los órganos aéreos y en la fertilidad, así como una curvatura en las hojas muy similar a la observada en los mutantes *clf-16*, lo que de nuevo sugiere una relación de epistasia de *CLF* sobre *SHL* (Fig. 39).

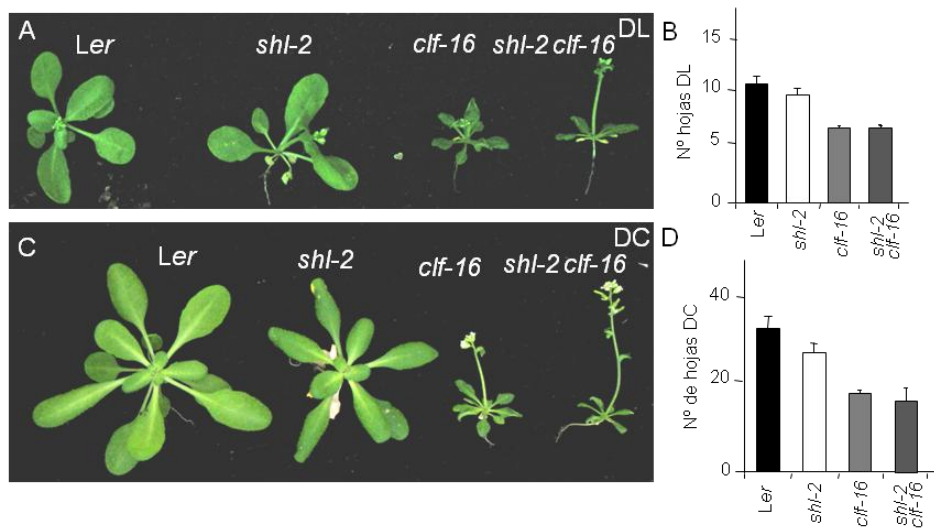


Fig. 39. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shl-2* con el mutante *clf-16*. A. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *clf-16* y *shl-2 clf-16* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y el doble en condiciones de DL. C. Fenotipo de plantas *Ler*, *shl-2*, *clf-16* y *shl-2 clf-16* cultivadas en condiciones de DC. D. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y el doble en condiciones de DC.

También generamos y analizamos el doble mutante *ebs clf-16*. En este caso, el doble mutante presenta un tiempo de floración más temprano que cualquiera de los dos parentales en condiciones de DL y DC; además, las plantas *ebs clf-16* no responden a la duración del día puesto que su tiempo de floración es prácticamente igual ambas condiciones de fotoperiodo (Fig. 40). Estos resultados sugieren una interacción sinérgica entre los loci *EBS* y *CLF* en el control de la transición floral. Por otro lado, el fenotipo del doble mutante *ebs clf-16* presenta alteraciones pleiotrópicas en diversos aspectos del desarrollo, especialmente en condiciones de DC. Como se puede observar en la figura 40 C, el porte de la planta doble mutante muestra un fenotipo de enanismo extremo, y el tamaño de las flores y los frutos está muy reducido, con una disminución considerable de la fertilidad.

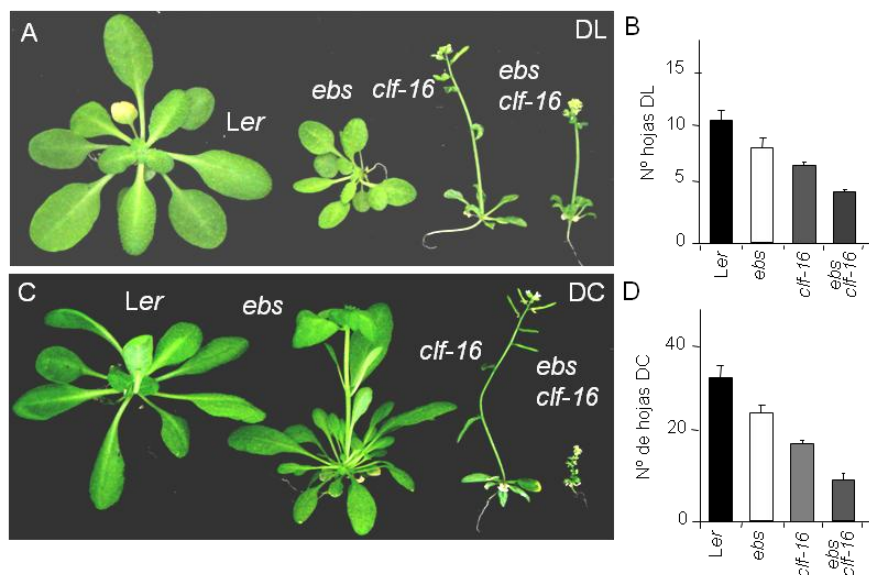


Fig. 40. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *ebs* con el mutante *clf-16*. A. Fenotipo de plantas *Ler*, *ebs*, *clf-16* y *ebs clf-16* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y el doble en condiciones de DL. C. Fenotipo de plantas *Ler*, *ebs*, *clf-16* y *ebs clf-16* cultivadas en condiciones de DC. D. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y el doble en condiciones de DC.

El fenotipo del doble mutante *ebs clf-16* sugiere que *EBS* y *CLF* poseen actividades separadas en el control del desarrollo en *Arabidopsis*, aunque como ambos loci regulan varios procesos generales del desarrollo, probablemente puedan compartir algunas funciones similares en el control del tiempo de floración.

Estos resultados indican que *EBS* y *SHL* interaccionan genéticamente con *CLF* de forma diferente. Estas observaciones están de acuerdo con el análisis genético descrito

anteriormente y son consistentes con que *EBS* y *SHL* desempeñan funciones independientes en el control del tiempo de floración.

4.2 Análisis de la expresión de los genes integradores florales *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *shl-2 clf-16* y *ebs clf-16*.

Las proteínas homólogas a las del PcG de *Drosophila* como CLF, FIE y EMF2 actúan reprimiendo la expresión de los genes integradores de la floración como *FT*, y de genes de identidad de meristemo y de órgano floral durante el desarrollo vegetativo (Pien y Grossniklaus, 2007; Jiang et al., 2008). Así, se ha demostrado que CLF se une directamente al locus *FT* y media la incorporación de la marca H3K27me3 en su cromatina (Jiang et al., 2008).

Puesto que tanto *EBS* como *SHL* también participan en la regulación de los integradores florales, decidimos examinar la expresión de *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *shl-2 clf-16* y *ebs clf-16*. Debido al fenotipo extremadamente temprano del doble mutante *ebs clf-16*, las muestras en este experimento se tomaron en un estadio de desarrollo más temprano (10 días en condiciones de DC) que permitiera analizar el comportamiento de los integradores florales antes de que tenga lugar la transición floral en los dobles mutantes. Como se observa en la figura 41, el mutante *clf-16* muestra ya un nivel más alto del mensajero de *FT* que el tipo silvestre; esto está de acuerdo con observaciones previas que han puesto de manifiesto que *CLF* está implicado en la represión de este integrador floral (Pien y Grossniklaus, 2007; Jiang et al., 2008). Además, el aumento en los niveles de *FT* es mayor en los dobles mutantes que el observado en el mutante *clf-16* y particularmente en el caso del doble mutante *ebs clf-16*. Asimismo, se observa que nuevamente, los mayores incrementos en la expresión de *SOC1* se encuentran en las plantas dobles mutantes *ebs clf-16* (Fig. 41). Estas observaciones están de acuerdo con el fenotipo extremo de floración temprana descrito previamente para el doble mutante *ebs clf-16*.

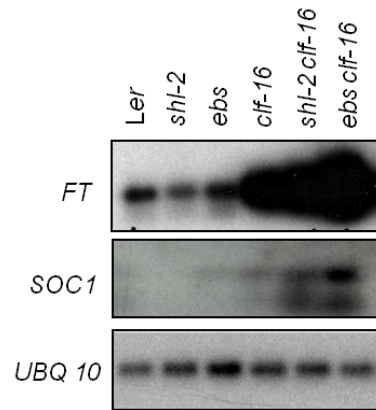


Fig. 41. Análisis de la expresión de los loci *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *ebs clf-16* y *shl-2 clf-16*. RT-PCR con plántulas de 10 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día. Como control de carga se usa el gen constitutivo *UBQ 10*.

4.3 Interacción entre *SHL* y *EBS* y el represor transcripcional *TFL2/LHP1*.

La proteína *TFL2/LHP1* está implicada en la represión de genes eucromatínicos (Nakahigashi et al, 2005) y colocaliza en el genoma de *Arabidopsis* con la marca de cromatina inactiva H3K27me3, dependiente de la actividad de complejos PRC2, por lo que se le ha asignado un papel en el mantenimiento estable de la represión génica similar al desempeñado por los complejos PRC1 de animales (Turk et al., 2007). *TFL2/LHP1* reprime la expresión de *FT*, por lo que las mutaciones en el locus *TFL2/LHP1* provocan floración temprana (Turck et al., 2007).

Para analizar una posible interacción entre *EBS* y *SHL* con *TFL2/LHP1*, generamos los dobles mutantes *shl-2 tfl2-1* y *ebs tfl2-1* y se analizó su fenotipo de floración. Las plantas dobles mutantes *shl-2 tfl2-1* muestran un fenotipo de floración más temprano que cada uno de los mutantes sencillos empleados como parentales. Además las plantas dobles mutantes presentan un enanismo muy extremo, y con una reducción drástica del tamaño de los órganos aéreos y una reducción muy acusada de la fertilidad, lo que sugiere la existencia de una interacción sinérgica entre ambos loci (Fig. 42).

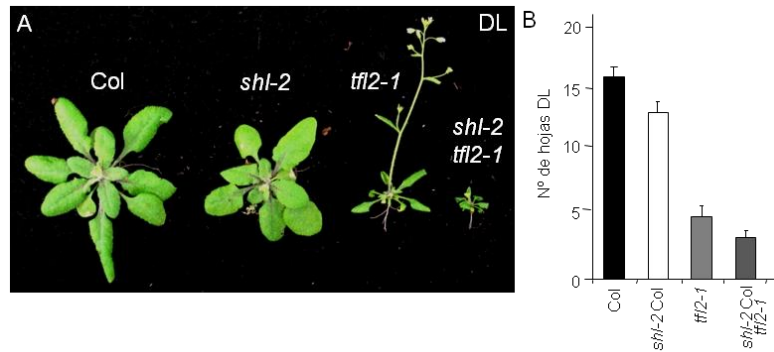


Fig. 42. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *shi-2* con el mutante *tfl2-1*. A. Fenotipo de plantas *Ler*, *shi-2*, *tfl2-1* y *shi-2 tfl2-1* cultivadas en condiciones de DL. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y el doble en condiciones de DL.

Al igual que en el caso de las plantas *shi-2 tfl2-1*, el tiempo de floración del doble mutante *ebs tfl2-1* en condiciones de DC presenta un tiempo de floración considerablemente más temprano que cualquiera de los dos parentales (Fig. 43), por lo que pudimos concluir que existe un sinergismo entre los loci *EBS* y *TFL2* para el control de la transición floral, tal y como ocurre con *SHL* y *TFL2*. Asimismo, la planta doble mutante presenta numerosas alteraciones pleiotrópicas del desarrollo con un fenotipo de enanismo extremo, reducción dramática de la fertilidad que hace a la planta doble mutante casi estéril, y una reducción del tamaño de flores y frutos (Fig. 43).

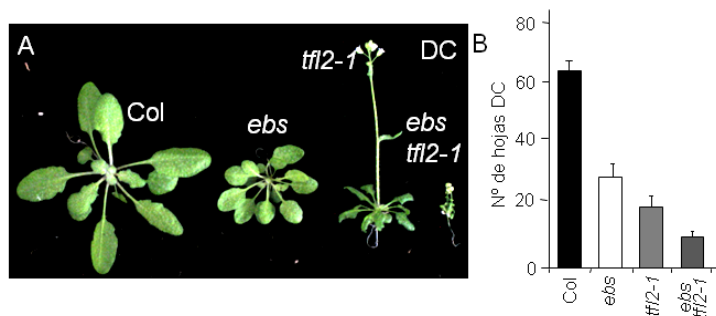


Fig. 43. Fenotipo de floración de los dobles mutantes que combinan *ebs* con el mutante *tfl2-1*. A. Fenotipo de plantas *Col*, *ebs*, *tfl2-1* y *ebs tfl2-1* cultivadas en condiciones de DC. B. Cuantificación del tiempo de floración de los mutantes sencillos y el doble en condiciones de DC.

4.4 Análisis de la expresión de los genes integradores florales *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *shi-2 tfl2-1* y *ebs tfl2-1*.

Como se comentó anteriormente, el fenotipo de floración temprana de los mutantes *tfl2/lhp1* se debe principalmente a una mayor expresión de *FT* (Kotake et al, 2003). Además,

TFL2/LHP1 reprime la transcripción de genes que actúan en diferentes etapas del desarrollo reproductivo y los resultados de los análisis transcriptómicos realizados hasta el momento, apuntan a que *TFL2* pueda tener un papel más general en la regulación de otros muchos genes con funciones aún poco conocidas (Nakahigashi et al, 2005; Turck et al., 2007).

El sinergismo observado entre los loci *EBS* y *TFL2* así como entre *SHL* y *TFL2* en el control del tiempo de floración nos llevó a analizar la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *shl-2 tfl2-1* y *ebs tfl2-1*. Con este propósito, se llevó a cabo un análisis de RT-PCR con plántulas de 10 días cultivadas en condiciones de DC. Las muestras se recogieron al final del período de luz (8 horas). Como se observa en la figura 44 y de acuerdo con trabajos anteriores la mutación *tfl2-1* provoca un aumento en la expresión de *FT* (Jiang et al., 2008); además, el incremento de expresión de *FT* en los dobles mutantes *shl-2 tfl2-1* y *ebs tfl2-1* es mayor que el observado en *tfl2-1*, lo que indica que *SHL* podría participar en la represión de *FT* en ausencia de un gen *TFL2* funcional.

En el caso de *SOC1*, comprobamos que la pérdida de función de *TFL2* también causa una desregulación temprana de la expresión de este integrador floral. Por otro lado, los dobles mutantes *shl-2 tfl2-1* y *ebs tfl2-1* tienen un efecto diferente sobre la expresión de *SOC1*. En los dobles mutantes *ebs tfl2-1* no se observa un incremento en los niveles del mensajero de *SOC1* con respecto al mutante sencillo *tfl2-1*, indicando nuevamente que en estas condiciones *EBS* no afecta a la expresión de *SOC1*, incluso en ausencia de un gen *TFL2* funcional (Piñeiro et al., 2003). Por el contrario, en el doble mutante *shl-2 tfl2-1* la expresión de *SOC1* es mayor que la que se detecta en los mutantes sencillos *shl-2* y *tfl2-1* (Fig. 44). Estos datos moleculares son consistentes con el sinergismo observado en el análisis genético, y confirman nuevamente que *EBS* y *SHL* desempeñan funciones independientes en el control de los integradores florales. Serán necesarios estudios adicionales para comprender en profundidad como estos factores implicados en la reorganización de la cromatina interaccionan en las regiones reguladoras de los integradores florales para controlar su expresión.

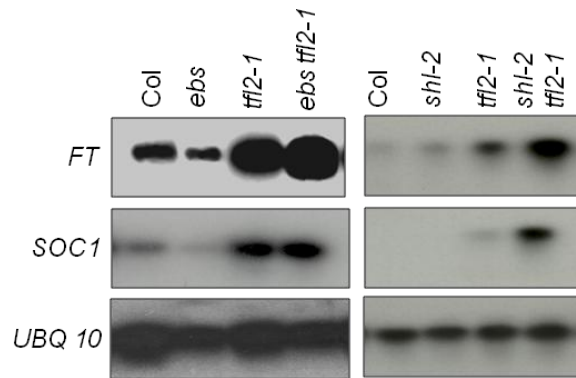


Fig. 44. Análisis de la expresión de los loci *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *sh1-2 tf12-1* y *ebs tf12-1*. RT-PCR con plántulas de 10 días cultivadas en condiciones de DC y recogidas a última hora del día. Como control de carga se usa el gen constitutivo *UBQ 10*.

5. Análisis de la posible interacción de las proteínas EBS y SHL con residuos modificados de la histona H3.

Las proteínas EBS y SHL poseen, un dominio BAH en su extremo amino y un dominio PHD en el extremo carboxilo. Ambos motivos están presentes en numerosos reguladores transcripcionales que actúan remodelando la estructura de la cromatina (Callebaut et al., 1999; Palacios et al., 2008; Champagne et al., 2008; Champagne y Kutateladze, 2009). Esto sugiere que EBS y SHL podrían formar parte de complejos proteicos implicados en la regulación de la expresión génica a través de mecanismos que remodelan la cromatina. Diversos trabajos han puesto de manifiesto que determinados dedos de Zn de tipo PHD presentes en proteínas animales son capaces de reconocer específicamente la marca H3K4me3. Inicialmente, la unión de dominios PHD a esta modificación covalente de la histona H3 se comprobó en los factores INHIBITOR OF GROWTH 2 (ING2) y Bromodomain PHD Finger Transcription Factor (BPTF) de humanos (Shi et al., 2006; Peña et al., 2006; Li et al., 2006; Wysocka et al., 2006). Posteriormente, esta interacción de dominios PHD con H3K4me3, se ha descrito para otros factores incluyendo a otros miembros de la familia ING de supresores tumorales, sus homólogos en levaduras YNG1, YNG2 y PHO23, los PHD de RAG2 y TAF3 en humanos y Pygopus (Pygo) en humanos y *Drosophila* (Martin et al., 2006; van Ingen et al., 2008; Champagne y Kutateladze, 2009).

También en *Arabidopsis* se han identificado homólogos de las proteínas ING (AtING) así como homólogos de las proteínas Alfin 1 (AL) que participan en procesos relacionados con la tolerancia a la sal en alfalfa (Bastola et al., 1998; Winicov y Bastola, 1999; Winicov, 2000).

Tanto las proteínas AtING como las proteínas AL contienen dominios PHD que reconocen H3K4, H3K4me2 y H3K4me3 (Lee et al., 2009). Otra proteína de Arabidopsis con un dominio PHD que reconoce H3K4me3 es la subunidad mayor del complejo del origen de replicación ORC1 (Sánchez y Gutierrez, 2009). Se ha propuesto que la interacción de ORC1 con este residuo modificado viene acompañada de cambios en el estado de la cromatina del gen diana, tales como un incremento en la marca H3K20me3 y en la acetilación de la histona H4 en sus regiones promotoras (Sanchez y Gutierrez, 2009). Estas observaciones nos sugirieron que los dominios PHD presentes en EBS y SHL podrían estar también implicados en el reconocimiento de esta marca epigenética. De hecho, tanto los residuos responsables de la unión a los átomos de Zn, como los implicados en la formación de la cavidad hidrofóbica que acoge a la K4 trimetilada en los motivos PHD de proteínas capaces de unir H3K4me3, se encuentran conservados en EBS y SHL. El mecanismo de unión del dominio PHD con el péptido H3K4me3 se definió analizando las estructuras cristalizadas de los dominios PHD de las proteínas ING. Se sabe que en dicha interacción, el péptido H3K4me3 forma una tercera lámina β antiparalela con respecto a las dos láminas β que conforman el dominio PHD. La marca H3K4me3 se coloca en una cavidad hidrofóbica que abarca un tercio del dominio PHD y que está formada en el caso de ING1, por los residuos Y212, S219, M223 Y W235 (Champagne y Kukateladze, 2009). Estos residuos que corresponden a Y148 en EBS y el W170 de EBS y W163 de SHL así como los residuos hidrofóbicos M161 de EBS y M154 de SHL, están conservados en las proteínas EBS y SHL. Además, como se observa en la figura 45 B, los modelos estructurales predichos para los dominios PHD de EBS y SHL son muy similares a los de dominios PHD para los que se ha demostrado la unión con H3K4me3, como los de la proteína BPTF de humanos (Champagne y Kukateladze, 2009).

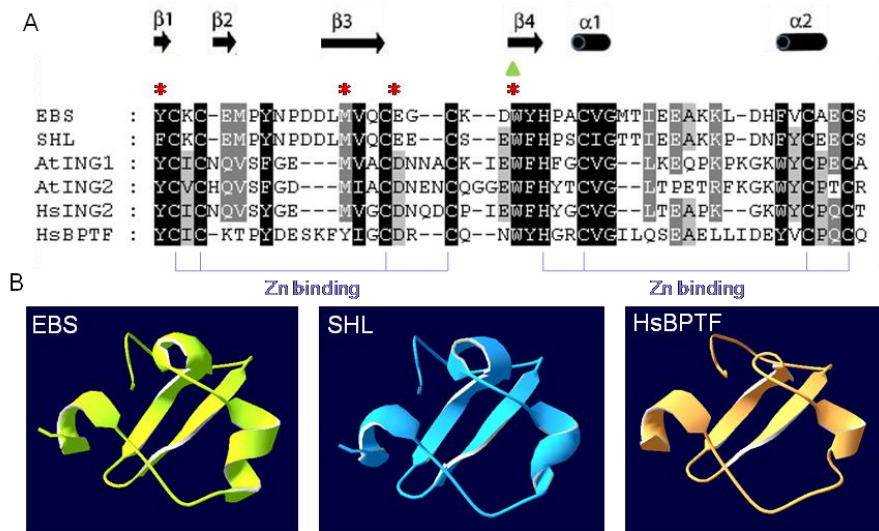


Fig. 45. Alineamiento de los dominios PHD presentes en EBS, SHL y otras proteínas de plantas y de humanos. A. Las 4 primeras secuencias corresponden a 4 proteínas de Arabidopsis y las dos últimas a dos proteínas de humanos (HsING2 y HsBPTF). En color negro se representan las zonas altamente conservadas, en gris zonas con una conservación media y en blanco las zonas no conservadas. Los asteriscos rojos representan los residuos importantes para la unión de H3K4me3. El triángulo verde representa el W mutagenizado empleado en experimentos sucesivos (Fig. 46 y 47). B. Modelo de la estructura tridimensional de los dominios PHD de EBS, SHL y Hs BPTF.

Por todo ello, decidimos examinar la capacidad de las proteínas EBS y SHL, y en concreto de sus motivos PHD, para unirse a residuos H3K4 portadores de distintos niveles de metilación. Para ello, las proteínas completas EBS y SHL, y el dominio funcional PHD se clonaron en vectores de expresión bacterianos. Tras su purificación posterior, se llevaron a cabo ensayos de unión a péptidos aminoterminales de histona H3 con diferentes niveles de metilación en la lisina 4, y ensayos de precipitación (pull-down) con histonas extraídas de células de Arabidopsis en cultivo (línea celular MM2d) (Fujiyama et al., 2002).

5.1 Ensayos de unión de EBS y SHL con péptidos biotinilados de la histona H3 modificados en la lisina 4.

Con el fin de analizar la posible interacción de EBS y SHL con péptidos de histonas con distintos niveles de metilación en la K4, generamos proteínas recombinantes en las que los dominios PHD de ambas proteínas llevan acoplados la proteína GST que facilita la purificación de dichas proteínas recombinantes mediante el empleo de resinas Glutathione Sepharose 4B. El dominio PHD clonado tiene un tamaño de 265 nucleótidos en el caso de EBS (aproximadamente 35 KDa) y de 338 nucleótidos en el caso de SHL (38KDa) (Fig. 46 A).

Además se generaron versiones mutadas de los dominios PHD tanto de EBS como de SHL (Fig. 46 A). Para ello el aminoácido triptófano en las posiciones 170 en la proteína EBS

(W170) y 163 (W163) en el caso de la proteína SHL se sustituyó mediante técnicas de mutagénesis dirigida por una alanina (E-PHD_{W170A}, S-PHD_{W163A}). Decidimos mutagenizar ese residuo porque estudios previos habían demostrado que este residuo de W tiene un papel esencial en la interacción de los dominios PHD con las histonas H3 metiladas en la lisina 4 (Champagne y Kutateladze, 2009). Para ensayar la unión de los dominios PHD de EBS (E-PHD) y SHL (S-PHD) y de sus versiones mutadas, E-PHD_{W170A} y S-PHD_{W163A} a residuos K4 de H3 metilados, realizamos los experimentos de pull-down con péptidos biotinilados de histonas modificados en la lisina 4: H3K4me0, H3K4me1, H3K4me2 y H3K4me3.

Como se puede observar en la figura 46 B, los dominios PHD de EBS y SHL, pero no la proteína GST, reconocen preferentemente los péptidos portadores de las marcas H3K4me2 y H3K4me3. Sin embargo, cuando se utilizan las versiones mutadas de ambos dominios, no se detecta dicha interacción, lo que sugiere que esta interacción tiene lugar de forma específica y que los residuos W170 en el caso de EBS y el W163 en el caso de SHL son esenciales para el reconocimiento de H3K4me2 y H3K4me3 por parte del motivo PHD de ambas proteínas y para la especificidad de la interacción.

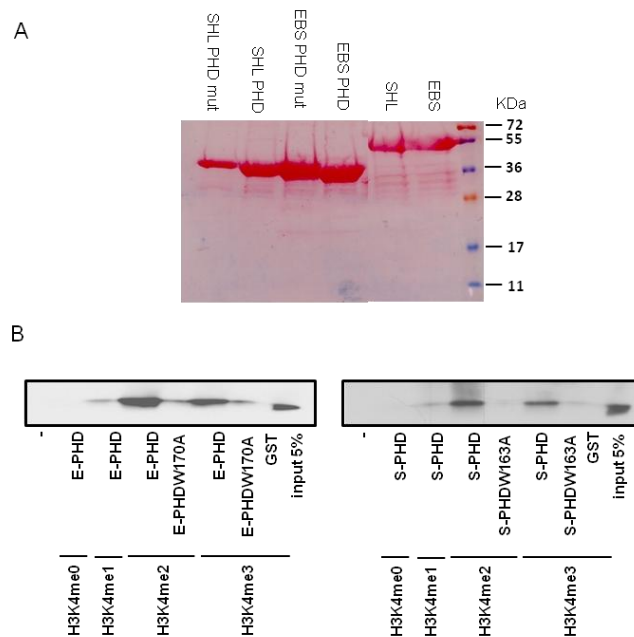


Fig. 46. Ensayo de unión de los dominios PHD de las proteínas EBS y SHL con péptidos biotinilados de histonas. A. Expresión de proteínas recombinantes expresadas en *E.coli*, analizadas en un gel de poliacrilamida al 12%, transferidas a una membrana de nylon y teñidas con rojo Ponceau. Se observa que el tamaño de las proteínas recombinantes obtenidas es el esperado para la la fusión con GST. Ensayo de unión de los dominios PHD de las proteínas EBS y SHL con péptidos biotinilados H3K4me0, H3K4me1, H3K4me2 y H3K4me3. La unión se detecta Streptavidina.

5.2 Ensayo de unión de EBS y SHL con histonas extraídas de células de Arabidopsis en cultivo.

Con el fin de confirmar las interacciones observadas, además de los experimentos de precipitación con los péptidos aminoterminales de la histona H3, también llevamos a cabo ensayos de unión con histonas extraídas de células MM2d de Arabidopsis en cultivo (Fujiyama et al., 2002). Este tipo de ensayos se han usado con éxito previamente para detectar la unión de la proteína ORC1 de Arabidopsis a la marca H3K4me3 (Sánchez y Gutierrez, 2009). En este caso empleamos los dominios E-PHD y S-PHD, sus versiones mutadas E-PHD_{W170A} y S-PHD_{W163A} previamente descritas, así como las proteínas completas EBS y SHL y sus correspondientes versiones mutagenizadas en los mismos residuos (EBS_{W170A} y SHL_{W163A}), todas ellas acopladas a GST. Las histonas unidas a dichas proteínas recombinantes se visualizaron en experimentos de Western blot, empleando un anticuerpo específico α H3K4me3. En la figura 47 A puede observarse que ambas proteínas completas, EBS y SHL, y sus dominios PHD se unen a la histona H3K4me3. Por el contrario, ni GST ni ninguna de las versiones mutadas empleadas es capaz de interactuar con la H3K4me3 presente en los extractos de histonas (Fig. 47 A). Este resultado confirma que EBS y SHL son capaces de interactuar con H3K4me3 in vitro, y que el dominio PHD presente en ambas proteínas es el responsable del reconocimiento de esta marca epigenética; además, estos resultados ponen de manifiesto nuevamente la importancia de los residuos W170 en el caso de EBS y W163 en el caso de SHL para dicha interacción. Con el fin de descartar una unión inespecífica de EBS y SHL con 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 otro residuo de lisina trimetilado, en concreto α H4K20me3. Como se muestra en la figura 47 B, no se detectó interacción de EBS ni de SHL con la histona H4 portadora de dicha marca epigenética, lo que nos permite concluir que la unión detectada de EBS y SHL a la histona H3 es específica.

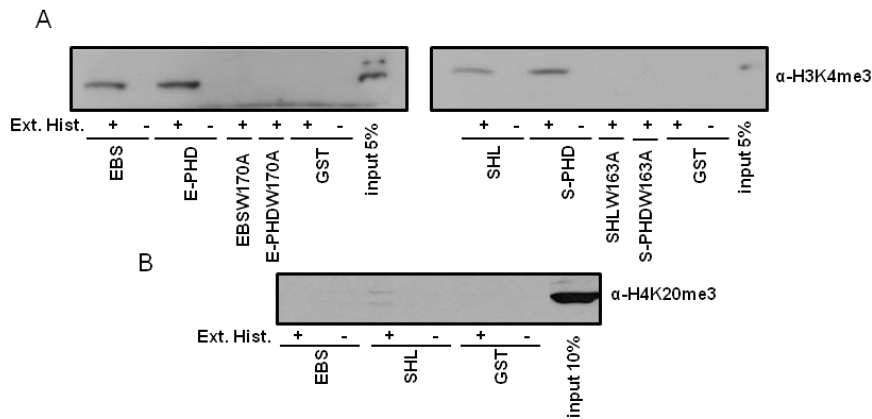


Fig. 47. Ensayo de unión de EBS y SHL a histonas H3K4me3 y H4K20me3 de Arabidopsis. A. Ensayo de unión a H3K4me3 de la proteína completa EBS (EBS), de EBS mutada en W170, de E-PHD y de E-PHDw170, y de la proteína completa SHL (SHL), de SHL mutada en W163, de S-PHD y de S-PHDw163 con (+) y sin (-) extracto de histonas procedentes de líneas celulares de Arabidopsis. La unión se detecta mediante un experimento de Western-blot con anticuerpos anti H3K4me3. Como input se utiliza un 5% del extracto de histonas. B. Ensayo de unión de las proteínas completas EBS y SHL con (+) y sin (-) extracto de histonas. La unión se detecta mediante un experimento de Western-blot con anticuerpos anti H4K20me3. Como input se utiliza un 10% del extracto de histonas.

6. Regiones discretas de la cromatina de *FT* y *SOC1* están enriquecidas en H3K9,K14 Ac en los mutantes *ews* y *shl-2* respectivamente.

Los resultados previos y los obtenidos en este trabajo indican que los loci *EBS* y *SHL* son necesarios para la represión de los integradores florales *FT* y *SOC1*, respectivamente. La presencia de dominios BAH y PHD en las proteínas EBS y SHL, así como su capacidad de interactuar con residuos de lisina 4 de la histona H3 metilados, sugieren que ambos loci podrían participar en el silenciamiento transcripcional de sus genes diana modulando el estado epigenético de la cromatina en las regiones genómicas de dichos genes. Diversos trabajos han demostrado que proteínas portadoras de dominios PHD capaces de reconocer residuos metilados de H3K4 se asocian a complejos remodeladores de cromatina que actúan modificando los niveles de acetilación de histonas, una marca de cromatina activa, en regiones reguladoras de sus genes diana. Este es el caso de las proteínas ING que se asocian tanto a complejos HISTONE ACETYL TRANSFERASA (HAT) como HISTONE DEACETYLASE (HDAC) (Skowryra et al., 2001; Kuzmichev et al., 2002; Doyon et al., 2006). Por ello, decidimos examinar si las proteínas EBS y SHL podrían actuar modulando los niveles de acetilación de histonas presentes en la cromatina de los genes cuya expresión se ve alterada en los mutantes *ews* y *shl-2*, es decir *FT* y *SOC1*, respectivamente. Para comprobarlo, llevamos a cabo experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con los mutantes *ews* y *shl-2*, utilizando

anticuerpos α -H3K9K14Ac. El DNA asociado a la cromatina inmunoprecipitada se utilizó para amplificar mediante PCR semicuantitativa diversos fragmentos correspondientes a regiones reguladoras de los genes *FT* y *SOC1*. El DNA amplificado para cada fragmento con la cromatina inmunoprecipitada de los mutantes *ebs* y *shl-2* se cuantificó y se relativizó con respecto al DNA amplificado con la cromatina inmunoprecipitada en la cepa silvestre. Además de los niveles de H3K9K14Ac, analizamos también los de otras modificaciones asociadas al estado transcripcional de la cromatina como H3K4me3, una marca activa, y H3K27me3 una marca inactiva.

6.1 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina del locus *SOC1* en mutantes *shl-2*.

SOC1 se encuentra expresado a niveles más altos en el mutante *shl-2* que en plantas de tipo silvestre *Ler*. Con el fin de determinar si la mutación *shl-2* podría alterar el establecimiento de marcas epigenéticas asociadas a estados transcripcionales en la cromatina de *SOC1*, realizamos un experimento de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con anticuerpos que reconocen específicamente las modificaciones covalentes de la histona H3 mencionadas anteriormente: α -H3K9K14Ac, α -H3K4me3 y α -H3K27me3.

La información existente acerca de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión de *SOC1* es escasa. Sin embargo, un trabajo previo de Bouveret et al., 2006 desveló que la correcta expresión de este locus requiere procesos de remodelación de cromatina en los que está implicado *MS1*. Esta proteína forma parte de complejos remodeladores de cromatina (Hennig et al., 2005) y es necesaria para establecer las modificaciones covalentes H3K9Ac y H3K4me2 en regiones discretas del gen *SOC1*; además, los niveles de dichas marcas epigenéticas en estas regiones están correlacionadas con la expresión del integrador floral *SOC1* (Bouveret et al., 2006). Puesto que las regiones genómicas descritas en este trabajo parecen ser importantes para la regulación epigenética de *SOC1*, decidimos centrar nuestro análisis de ChIP en estos fragmentos genómicos correspondientes al promotor y al primer intrón de *SOC1* (Fig. 48 A). Como se puede observar en la figura 48 B y C los niveles de acetilación de la histona H3 en el mutante *shl-2* son significativamente mayores (4-5 veces) en las regiones II, III y IV del locus *SOC1*, que en la planta silvestre. En cambio, los niveles de H3K9,K14Ac en la región I son similares en plantas mutantes *shl-2* y *Ler*, lo que sugiere que la función de *SHL* es necesaria para mantener bajos niveles de acetilación de H3K9,K14 en el intrón 1 de *SOC1*. A diferencia de lo observado con H3K9,K14Ac, los niveles de H3K4me3 y H3K27me3 son muy similares en el mutante y la planta silvestre para todas las regiones analizadas. Las diferencias detectadas en los niveles de acetilación de las regiones analizadas

en el locus *SOC1* son consistentes con el aumento de expresión de este gen integrador floral observado en el mutante *shl-2*.

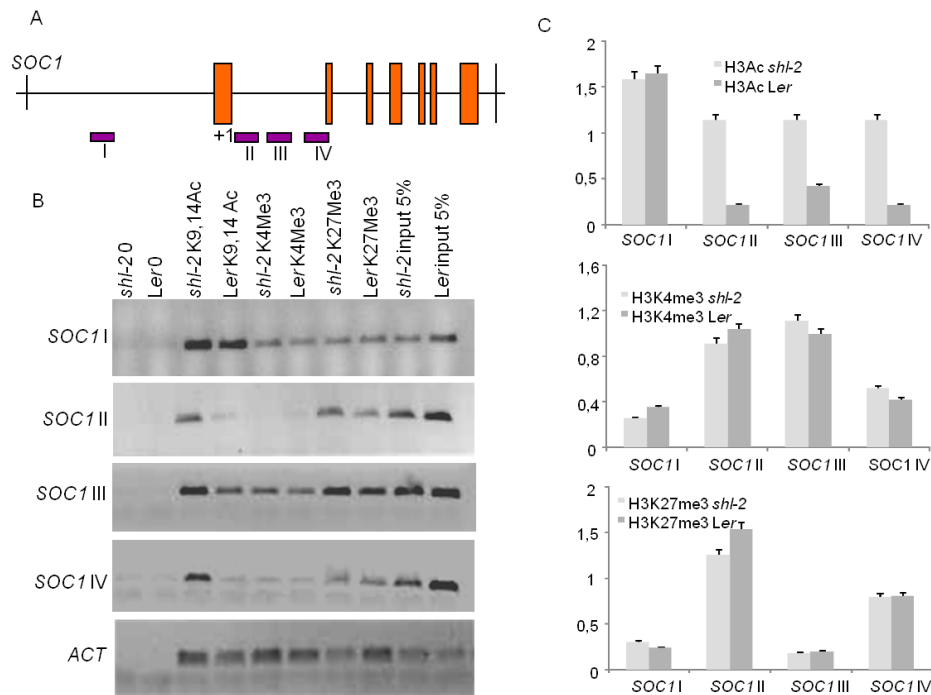


Fig. 48. Análisis mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de regiones discretas de la cromatina de *SOC1* utilizando los anticuerpos α -H3K9K14Ac, α -H3K4me3 y α -H3K27me3. A. Esquema de la estructura genómica de *SOC1* indicando las regiones analizadas. B. Ensayos de RT-PCR para regiones discretas de la cromatina de *SOC1* utilizando como molde DNA inmunoprecipitado de *Ler* y de *shl-2* con los anticuerpos indicados. Como control del ensayo se utilizó el gen de la *Actina 2*. El valor 0 corresponde a muestras tratadas de la misma forma que la cromatina inmunoprecipitada pero sin anticuerpo y el input representa el 5 % de la cantidad de molde empleado en la inmunoprecipitación.

6.2 Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina del locus *FT* en los mutantes *eb*s.

EBS es necesario para reprimir la expresión del integrador floral *FT* (Piñeiro et al; 2003). Por ello, examinamos si al igual que ocurre con SHL, EBS está implicado en modular el establecimiento de modificaciones de la cromatina de *FT* que pudieran estar asociadas con su estado transcripcional. Mediante experimentos de ChIP con los mismos anticuerpos descritos anteriormente para el locus *SOC1*, determinamos los niveles de acetilación y metilación de la histona H3 en diferentes regiones discretas de la cromatina del locus *FT* en los mutantes *eb*s y su parental silvestre *Ler*. En *FT* hay dos zonas hiperacetiladas, una proximal y la otra distal en el promotor, cuando el gen está sobreexpresado, indicando que estas zonas serían importantes para la expresión de *FT* (Adrian et al, 2010). La proximal coincide con la región próxima al codón de iniciación y la distal se localiza a 5,7 Kb del mismo.

Como se observa en la figura 49 B y C, las regiones IV y VI de la cromatina del locus *FT* presentan mayores niveles de H3K9K14Ac en el mutante *ebs* que en *Ler*; en concreto, la zona IV tiene unas 9 veces más acetilación en el mutante *ebs* que en el parental silvestre *Ler* y en la zona VI, 6 veces, mientras que no se observan cambios en las zonas II y VII. Tampoco se detectaron cambios entre *Ler* y *ebs* para las marcas H3K4me3 y H3K27me3 en ninguna de las regiones genómicas analizadas del locus *FT*. Estos datos podrían sugerir que las diferencias de expresión encontradas para el gen *FT* entre el mutante *ebs* y la planta silvestre, estarían asociadas a los diferentes niveles de acetilación observados en las regiones IV y VI de la cromatina de la región promotora de *FT*. Por lo tanto, EBS parece ser necesario para mantener bajos los niveles de H3K9,K14Ac durante los estadios iniciales del desarrollo de *Arabidopsis*, e impedir así una activación prematura de la expresión de *FT*. Además, estas observaciones son consistentes con las que hemos descrito anteriormente para la regulación de *SOC1* por SHL. Serán necesarios estudios posteriores que nos ayuden a desvelar como las proteínas EBS y SHL interaccionan con otros reguladores de la expresión de los integradores florales, y que complejos de remodelación de la cromatina median el efecto que tienen dichas proteínas sobre los niveles de acetilación de histonas en sus genes diana.

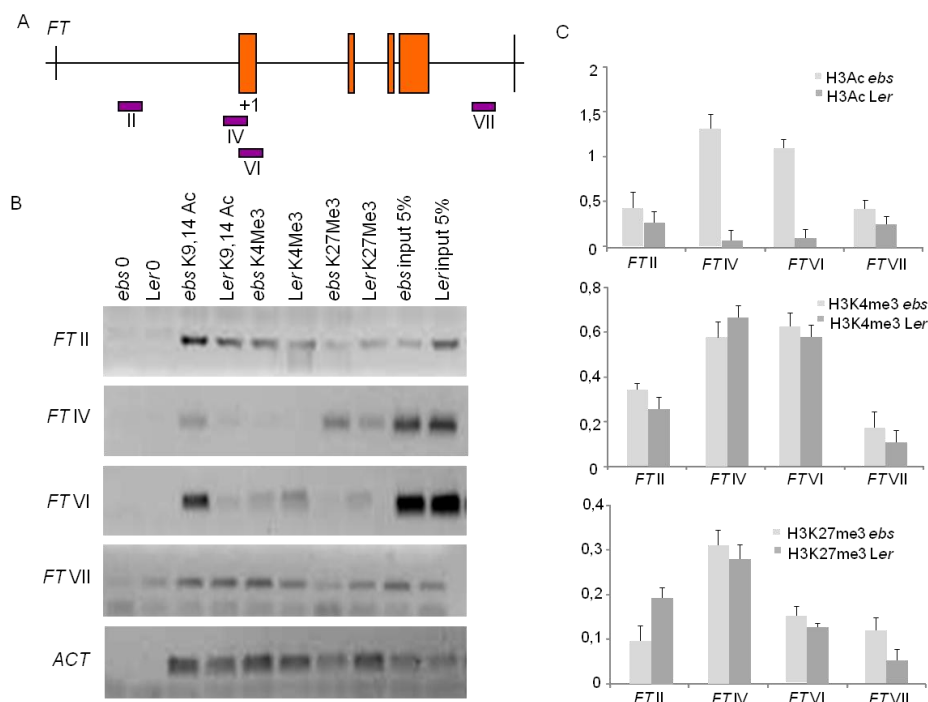


Fig. 49. Análisis mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de regiones discretas de la cromatina de *FT* utilizando los anticuerpos α -H3K9K14Ac, α -H3K4me3 y α -H3K27me3. A. Esquema de la estructura genómica de *FT* indicando las regiones analizadas. B. Ensayos de RT-PCR para regiones discretas de la cromatina de *FT* utilizando como molde DNA inmunoprecipitado de *Ler* y de *ebs* con los anticuerpos indicados. Como control del ensayo se utilizó el gen de la *Actina2*. C. Cuantificación del experimento de RT-PCR. El valor 0 corresponde a muestras tratadas de la misma forma que la cromatina inmunoprecipitada pero sin anticuerpo y el input representa el 5 % de la cantidad de molde empleado en la inmunoprecipitación.

6.3 EBS se une a regiones reguladoras del integrador floral *FT*.

Los datos obtenidos a lo largo de este trabajo y resultados anteriores indican que EBS es necesario para reprimir la expresión de *FT*, y que EBS estaría implicado en modular la estructura de la cromatina de este gen maestro de la floración. Sin embargo, hasta el momento no disponemos de datos que nos permitan establecer si EBS regula directamente a *FT*, uniéndose a regiones reguladoras de este locus o lo hace indirectamente. Recientemente se ha publicado que son varios los represores transcripcionales que participan directamente en la regulación de *FT*, uniéndose a sus regiones reguladoras. FLC y SVP forman un complejo que se une a regiones del promotor de *FT* y a cajas CARG del primer intrón (Searle et al., 2006; Li et al., 2008). TEMPRANILLO 1 (TEM 1), un factor de transcripción de tipo AP2-like, se une a la región 5'UTR de *FT*, reconociendo los sitios CAACA y CACCTG que están localizados justo antes del codón de iniciación (Castillejo y Pelaz, 2008); estas cajas de unión se encuentran situadas en una de las regiones (IV) en la que observamos cambios en los niveles de acetilación de H3K9,K14 como consecuencia de la mutación *ebs*. También se han identificado proteínas con actividad demetilasa de histonas como AtJmj4 y ELF6 que reprimen la expresión de *FT* demetilando H3K4 (Jeong et al., 2009). Tanto ELF6 como AtJmj4 se unen directa y específicamente con la región de inicio de la transcripción de *FT*, donde además se observan cambios en los niveles de H3K4me3 en los mutantes *elf6* y *Atjnj4* (Jeong et al., 2009).

Con el propósito de determinar si EBS interacciona físicamente con regiones genómicas del locus *FT*, llevamos a cabo experimentos de CHIP. Para ello, empleamos un anticuerpo generado contra un péptido que contiene el extremo carboxilo de EBS. Tal como se muestra en la figura 50 A, el anticuerpo obtenido reconoce específicamente a EBS producido en bacteria, pero no a SHL.

El anticuerpo específico contra EBS sólo detecta la presencia de esta proteína en extractos de las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen (35S::*EBS*) y no en *Ler*. Es posible que la escasa abundancia de la proteína no permita su detección por este procedimiento en el tipo silvestre. Alternativamente, esta observación podría deberse a que EBS es una proteína nuclear, probablemente asociada a cromatina, y por lo tanto, poco representada en extractos proteicos totales. De acuerdo con esta hipótesis, la presencia de la proteína sí se observa en los extractos enriquecidos en histonas (Fig. 50 B).

Con el fin de detectar la presencia de la proteína EBS en regiones reguladoras de *FT* llevamos a cabo experimentos de CHIP con el anticuerpo α -EBS, analizando las zonas IV y VI del locus *FT*, donde se habían observado mayores cambios en los niveles de acetilación entre el

mutante *ebs* y su parental silvestre *Ler* (Fig. 49). Como se observa en la figura 50 C, en el DNA precipitado con el anticuerpo α -EBS pudimos amplificar las secuencias correspondientes a la zona IV de la cromatina de *FT* en las plantas *35S::EBS*, pero no en las plantas del ecotipo silvestre. Sin embargo, en la zona VI no se detecta la presencia de la proteína EBS ni en *Ler* ni en plantas *35S::EBS* (Fig. 50 C). Este resultado sugiere que EBS podría estar interactuando directamente con la zona 5' UTR de *FT*. Esta es la región en la que se produce un mayor incremento en la acumulación de H3K9K14Ac en el mutante *ebs*, y además solapa con una región altamente conservada que ha sido identificada como esencial para la activación de *FT* (Adrian et al., 2010). Estas observaciones son consistentes con que EBS contole la expresión del integrador floral *FT* uniéndose a regiones reguladoras de este locus; esta interacción podría favorecer el reclutamiento de complejos HDAC que serían los responsables de mantener bajos los niveles de acetilación de histonas en las regiones próximas al ATG de la cromatina de *FT* (Fig. 49 B y C). Además, este resultado también es similar al publicado por Jeong et al., 2009, donde se observa que los sitios de unión de las proteínas ELF6 y AtJmj4 en el locus *FT*, coinciden con la zona donde se observan cambios en los niveles de H3K4me3 entre los mutantes y el ecotipo silvestre (Jeong et al., 2009).

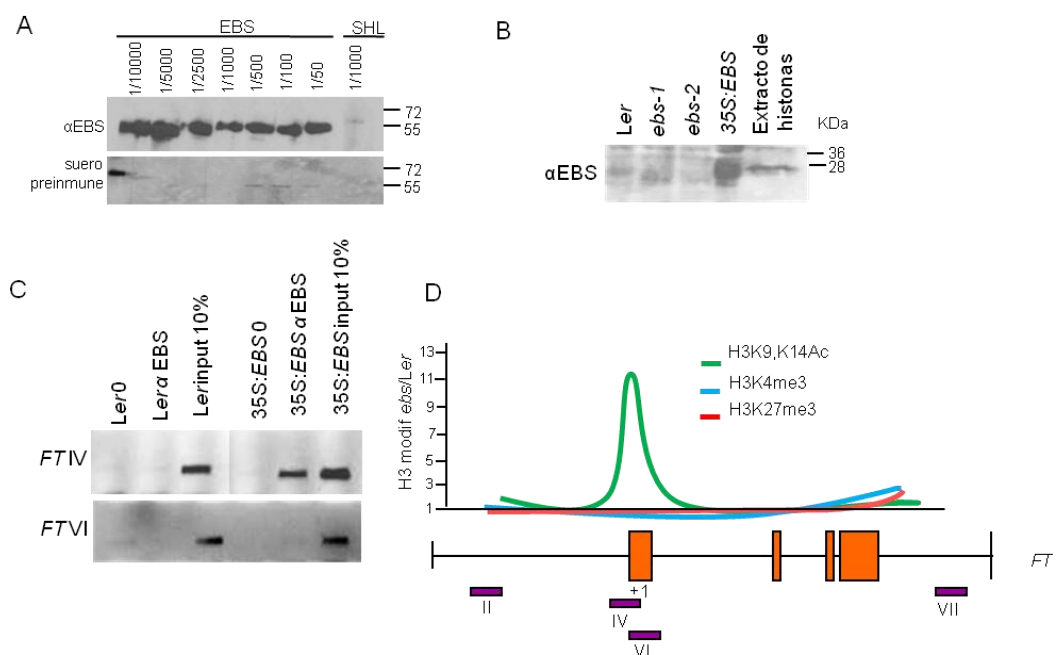


Fig. 50. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y análisis de la región IV de la cromatina de *FT* utilizando un anticuerpo α -EBS. A. Titulación del anticuerpo α -EBS frente a las proteínas EBS-GST y SHL-GST producidas en bacteria. B. Western-blot con plantas *Ler*, *ebs-1*, *ebs-2*, *35S::EBS* y con un extracto de histonas extraído de cultivos celulares de *Arabidopsis*. El anticuerpo empleado es el obtenido frente a la región carboxilo terminal de EBS. C. Ensayos de RT-PCR para las regiones IV y VI de la cromatina de *FT* utilizando como molde DNA inmunoprecipitado de plantas *Ler* y *35S::EBS* con el anticuerpo α -EBS. D. Esquema de la estructura genómica de *FT* indicando los niveles relativos de H3Ac, H3K4me3 y H3K27me3 en los mutantes *ebs* con respecto a los del parental silvestre *Ler*.

DISCUSIÓN

El desarrollo de los organismos eucarióticos está controlado por patrones de expresión génica finamente regulados tanto espacial como temporalmente. En animales la formación de órganos tiene lugar durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, en plantas los procesos de organogénesis y diferenciación continúan a lo largo de todo su ciclo de vida, durante el cual atraviesan diversas fases de desarrollo; cada una de estas etapas se caracteriza por presentar patrones de diferenciación celular específicos. Además, las plantas son capaces de modular su desarrollo en respuesta a una combinación de factores medioambientales y endógenos, y esta plasticidad les proporciona una gran ventaja adaptativa.

Varios trabajos han puesto de manifiesto el papel central que desempeñan los procesos de remodelación de la cromatina en el establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión génica que gobiernan el desarrollo de las plantas. Además, la organización de la estructura de la cromatina proporciona un mecanismo que asegura la estabilidad de los patrones de expresión a lo largo de las divisiones mitóticas que tienen lugar en una línea celular (Jarillo et al., 2009). En animales los estados epigenéticos que controlan el desarrollo se establecen en estadios tempranos del desarrollo. En cambio, en especies vegetales los interruptores epigenéticos que controlan las transiciones de fase sufren modificaciones durante el desarrollo post-embrionario. Esto sugiere que la dinámica estructural de la cromatina en plantas proporciona una mayor flexibilidad a los mecanismos de regulación de la expresión génica y facilita la plasticidad del desarrollo vegetal.

En *Arabidopsis*, la expresión de determinados genes maestros del desarrollo, y en particular genes centrales en el control de la transición floral, está regulada por diferentes modificaciones que afectan a la organización de su cromatina (He, 2009). De hecho, el control transcripcional de *FLC* durante la respuesta de vernalización se ha convertido en un modelo de regulación epigenética de la expresión génica en plantas, habiéndose identificado diferentes factores que remodelan la cromatina y que están implicados tanto en la activación como en la represión de este represor floral (Kim et al., 2009; Crevillén y Dean, 2010). La activación de la expresión de *FLC* se asocia con una serie de modificaciones epigenéticas de diversos residuos presentes en los extremos amino terminales de las histonas tales como la acetilación de las histonas H3 y H4, la metilación en la lisina 4 de la H3, la monoubiquitinación de H2B y la metilación en la lisina 36 de H3; asimismo, la presencia de la variante histónica H2A.Z también es necesaria para la activación de *FLC* (Kim et al., 2009). Por su parte, la represión de la expresión de *FLC* depende también de diversas marcas epigenéticas como la deacetilación de histonas, la demetilación de H3K4, la metilación de H3K9 y K27, y la metilación de residuos de arginina (He, 2009). Diversos estudios recientes han desvelado que, además de *FLC*, la

expresión de otros genes centrales, en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis* como el integrador floral *FT*, también está regulada por procesos de reorganización de la cromatina (Adrian et al., 2010), confirmando el papel esencial que desempeñan los mecanismos de regulación epigenética en la transición floral. A pesar del avance experimentado en los últimos años, las bases moleculares de los procesos de remodelación de cromatina implicados en el control de diversos procesos de desarrollo vegetal, incluida la transición floral, permanecen en gran medida desconocidas.

1. Caracterización funcional del locus *SHL*.

En el presente trabajo, hemos abordado la caracterización funcional del gen *SHL* de *Arabidopsis*, empleando para ello herramientas genéticas y moleculares. El gen *SHL* codifica una proteína nuclear con un dominio BAH en el extremo amino y un dominio PHD en el extremo carboxilo (Müssig et al., 2000). Proteínas con la misma distribución de dominios funcionales y un alto nivel de homología con *SHL* se han encontrado en multitud de especies vegetales; la primera de ellas se describió en cebada como *ES43* (Speulman y Salamini, 1995), y posteriormente se han encontrado en otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas, tanto herbáceas como leñosas. Sin embargo, estas proteínas constituidas esencialmente por un dominio BAH y un PHD no se han descrito en hongos ni en animales, lo que sugiere que serían exclusivas del reino vegetal. En *Arabidopsis*, esta disposición de dominios es compartida por otras dos proteínas, *EBS* y *EBL2*. *EBS* funciona como un regulador negativo de la transición floral, reprimiendo la expresión del integrador floral *FT* (Piñeiro et al., 2003). Además la proteína *EBS* está implicada en la regulación de otros procesos de desarrollo como la especificación de órganos florales o la dormición de la semilla (Gómez-Mena et al., 2001; Piñeiro et al., 2003). Por su parte, *EBL2* es una proteína predicha para la que no se han encontrado ESTs en bases de datos públicas de *Arabidopsis*.

El dominio BAH está presente en diversas proteínas asociadas a la cromatina tales como el Silent Information Regulator 3 (*Sir3*), la proteína *Orc1*, o las subunidades del complejo *RSC* (Remodeling Structure Chromatin) de levaduras, *Rsc1* y *2* (Callebaut et al., 1999). Además, el motivo BAH de *Sir3* está implicado en la extensión del silenciamiento a lo largo de loci de apareamiento (“mating type”), telómeros y *rDNA*, y es capaz de unirse a nucleosomas y a tetrámeros *H3/H4* (Onishi et al., 2007; Sampath et al., 2009).

El otro dominio presente en *SHL* es un dedo de zinc (zinc finger) de tipo PHD (*C4HC3*) (Aasland et al., 1995; Bienz, 2006) que se identificó por primera vez en la proteína de

Arabidopsis HAT3.1 (Schindler et al., 1993). Estudios recientes realizados en levaduras y animales han demostrado que los dominios PHD reconocen y se unen a marcas epigenéticas tales como H3K4me3 y H3K4me2; además, las proteínas portadoras de estos dominios funcionales son capaces de traducir estas modificaciones de las histonas en patrones de expresión génica, reclutando para ello complejos remodeladores de cromatina, fundamentalmente implicados en modular los niveles de acetilación de histonas, a las regiones reguladoras de sus genes diana (Martín et al., 2006; Pena et al., 2006; Shi et al., 2006, 2007; Taverna et al., 2006; Wisocka et al., 2006; Matthews et al., 2007; Champagne et al., 2008; van Ingen et al., 2008; Palacios et al., 2008). Además, determinados dominios PHD parecen ser capaces de reconocer otras modificaciones postraduccionales de las histonas tales como H3K4me0 (Lan et al., 2007), H3K9me2/1 (Iwase et al., 2007; Karagianni et al., 2008; Li et al., 2008), y H3K36me3 (Shi et al., 2007). En Arabidopsis, proteínas que contienen dominios PHD están implicadas en diferentes procesos de regulación celular y del desarrollo. Por ejemplo la meiosis durante la gametogénesis masculina requiere proteínas que contienen un dominio PHD, como Male Meocyte Death 1 (MMD1) (Yang et al., 2003), MS1 (Wilson et al., 2001) y DUET (Reddy et al., 2003). Por su parte ENHANCED DOWNY MILDEW 2 (EDM2), está implicada en la resistencia frente a patógenos (Eulgen et al., 2007), mientras que OBERON1 y OBERON2 son cruciales para el establecimiento y mantenimiento del meristemo (Saiga et al., 2008). ORC1, que es la subunidad mayor del complejo del origen de replicación, también contiene un dominio PHD y recientemente se ha descrito su implicación en la regulación transcripcional (Sanchez y Gutierrez, 2009). El silenciamiento epigenético de la vernalización también requiere de la participación de proteínas que contienen dominios PHD como VIN3 (Sung and Amasino, 2004), VIL1/VRN5 (Sung et al., 2006; Greb et al., 2007), y mutaciones que afectan a los genes que codifican estas proteínas alteran el patrón de modificaciones de las histonas que se producen en la cromatina de FLC tras la exposición de las plantas a periodos prolongados de frío. Por último, otras proteínas de Arabidopsis portadoras de dominios PHD son las AtING, homólogas de la familia ING, que en mamíferos, llevan a cabo funciones esenciales en la reparación del DNA, tumorigénesis, apoptosis y senescencia (Soliman and Riabowol, 2007) y las proteínas AL, similares a Alfin1, que participan en procesos de tolerancia a la sal en alfalfa (Bastola et al., 1998; Winicov y Bastola, 1999; Winicov, 2000).

Todas estas observaciones sugieren que la proteína SHL, al igual que EBS, formaría parte de una familia de reguladores transcripcionales específicos de plantas, implicados en modular la dinámica estructural de la cromatina. Sin embargo, el mecanismo molecular por el que estas proteínas participan en la regulación de la expresión génica en plantas permanece

en gran medida desconocido. Desvelar el modo de acción de estas proteínas exclusivas de plantas contribuirá a comprender mecanismos de control de la transcripción que operan en especies vegetales. Por ello, además de la caracterización funcional de *SHL*, en este trabajo nos hemos propuesto abordar el estudio de la función de las proteínas EBS y SHL a nivel bioquímico.

Con el fin de caracterizar funcionalmente el gen *SHL* y establecer si, como *EBS*, está implicado en la regulación de procesos de desarrollo en *Arabidopsis*, en el curso de este trabajo hemos analizado por primera vez alelos de pérdida de función para dicho locus. En concreto, hemos caracterizado dos alelos de inserción para el locus *SHL*, *shl-1* en fondo Col y *shl-2* en fondo Ler. La caracterización molecular de ambos alelos indica que *shl-2* sería un alelo nulo en el que no se detecta la presencia del mRNA del gen, mientras que *shl-1* podría dar lugar a una proteína truncada (Fig. 11). El fenotipo del mutante *shl-2* muestra una aceleración de la floración, especialmente en condiciones de DC, consistente con un papel de *SHL* en la represión floral. Además, *shl-2* muestra otras alteraciones fenotípicas como la disminución del tamaño de la mayoría de sus órganos aéreos (Fig. 12, 14 y 15), una reducción en la duración de la fase vegetativa adulta (Fig. 13) o una aceleración de la senescencia de la planta (Fig. 16). Algunas de estas alteraciones observadas en el mutante *shl-2* están presentes también en los mutantes *ews* (Gómez- Mena et al., 2001), si bien en éstos los defectos en el desarrollo son más acusados que en *shl-2*. El mutante *ews* presenta una aceleración mayor de la floración que *shl-2* tanto en DL como en DC y el tamaño de los órganos aéreos es menor que el de los mutantes *shl-2* (Gómez-Mena et al., 2001). Otros mutantes de floración temprana a menudo muestran defectos similares que afectan a la morfología de la hoja (Pouteau et al., 2004) o a la arquitectura floral o de la inflorescencia (Sung et al., 2004; Reeves y Coupland, 2001; Soppe et al., 1999; Goodrich et al., 1997), tales como *clf* (Goodrich et al., 1997) o *tf12* (Larsson et al., 1998; Gaudin et al., 2001; Kotake et al., 2003), y también están afectados en genes que codifican proteínas que participan en mecanismos de remodelación de cromatina. Esto sugiere que *SHL*, al igual que otros represores florales, probablemente desempeñe un papel como componente o como regulador de procesos básicos de la maquinaria celular que ha sido reclutado a lo largo de la evolución para participar en la regulación de diferentes procesos de desarrollo, ya sea reprimiendo la transición floral, regulando la arquitectura general de la planta y/o la formación del meristemo floral. El patrón de expresión observado para *SHL* es consistente con esta interpretación, ya que el mRNA de este gen está presente en todos los órganos y en todos los estadios de desarrollo analizados (Fig. 5, 6 y 8).

El fenotipo de floración temprana observado en los mutantes *ebs* y *shl-2* indica que *EBS* y *SHL* no son totalmente redundantes en el control del tiempo de floración. Sin embargo, ambos genes tienen un patrón de expresión similar y codifican proteínas con un alto grado de homología y con la misma distribución de dominios funcionales, por lo que es posible especular que los dos loci desempeñen funciones parcialmente redundantes en el control del tiempo de floración y en otros procesos del desarrollo. Análisis llevados a cabo con dobles mutantes *shl-2 ebs*, indican que estos presentan un fenotipo de floración temprana más extremo que el de los dos mutante sencillos y son prácticamente insensibles al fotoperiodo (Fig. 18); además las plantas *shl-2 ebs* muestran alteraciones pleiotrópicas del desarrollo que afectan a todos los órganos aéreos de la planta y que causan una disminución dramática de su fertilidad (Fig. 20). El análisis del doble mutante *shl-1 ebs* corrobora la existencia de cierta redundancia funcional entre ambos loci para el control del tiempo de floración. Al igual que los dobles mutantes *shl-2 ebs*, las plantas *shl-1 ebs* presentan un fenotipo de floración más temprano que *ebs* en ambas condiciones de fotoperiodo (Fig. 19), a pesar de que el mutante *shl-1* no muestra alteraciones en el tiempo de floración (Fig. 20). Los dobles mutantes *shl-1 ebs* también presentan otros defectos pleiotrópicos del desarrollo como una reducción considerable del porte de la planta y de su fertilidad. (Fig. 12). Además tanto el tamaño de sépalos y pétalos como el tamaño de los frutos está muy reducido en los dobles mutantes *shl ebs* (Fig. 20). Estos datos sugieren que *EBS* y *SHL* tienen funciones al menos parcialmente redundantes en el control del inicio de la floración y también en otros aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*, como el desarrollo de flores y frutos. De hecho, la mutación *ebs* provoca un incremento en los niveles de expresión de los genes homeóticos florales *AP3*, *PI*, y *AG* y rescata parcialmente el fenotipo de los mutantes *lfy-6* (Gómez-Mena et al., 2001), por lo que a la vista del fenotipo floral de los dobles mutantes *shl ebs*, no podemos descartar una posible participación de *SHL* en la especificación de los órganos florales.

Puesto que las funciones de *EBS* y *SHL* en la regulación del tiempo de floración no son totalmente redundantes, estos loci podrían interactuar con las rutas genéticas que controlan la transición floral de forma diferente. Con el fin de determinar a qué nivel participa *SHL* en el control de la represión floral en *Arabidopsis*, generamos dobles mutantes de *shl-2* con mutantes representativos de las distintas rutas inductoras de la floración. El análisis del tiempo de floración de los dobles mutantes generados entre *shl-2* y diferentes mutantes de la ruta del fotoperiodo como *co-2* y *gi-3*, o de la ruta de síntesis de las giberelinas como *ga 2-1*, indica que *SHL* no interacciona directamente con ninguna de estas dos rutas (Fig. 21 y 23). En el caso de los dobles mutantes de *shl-2* con la ruta del fotoperiodo, los resultados son similares a los

obtenidos previamente en el análisis genético con los mutantes *ebs* (Gómez-Mena et al., 2001); en cambio, *EBS* y *SHL* muestran un comportamiento diferente en su interacción con la ruta de inducción de la floración dependiente de la síntesis de GA, ya que el fenotipo temprano de los mutantes *ebs* es suprimido totalmente por mutaciones que afectan a la biosíntesis de estas hormonas (Gómez-Mena et al., 2001). Consistente con el análisis genético, el patrón de expresión del gen *CO* a lo largo del día no se encuentra alterado en los mutantes *shl-2* (Fig. 30 y 31), siendo similar al del tipo silvestre (Suarez-López et al., 2001) y al observado en los mutantes *ebs* (Piñeiro et al., 2003). Del mismo modo, la expresión del gen *GA5*, que codifica un enzima clave de la biosíntesis de GAs, la GA 20 oxidasa (Xu et al., 1995), cuya expresión está modulada por los niveles de GAs, no mostró cambios significativos en el mutante *shl-2* (Fig. 33). Todas estas observaciones nos llevaron a concluir que *SHL* no actuaría modulando negativamente las rutas de inducción de la floración dependientes de fotoperiodo y de la síntesis de GAs.

Al analizar el tiempo de floración de los dobles mutantes de *shl-2* con mutaciones en genes de la ruta autónoma, observamos que las mutaciones en *FVE* y *FCA* suprimen solo parcialmente el fenotipo temprano de los mutantes *shl-2* en condiciones de DL (Fig. 22 A). En condiciones de DC, el doble mutante *shl-2 fve-1* se comporta de una forma similar a como lo hace en DL; en cambio, el doble mutante *shl-2 fca-1* florece con un número de hojas muy similar a las que produce el mutante sencillo *fca-1*, lo que no nos permite descartar una posible interacción genética entre *SHL* y *FCA* (Fig. 22 B). Los genes integrantes de la ruta autónoma actúan inhibiendo la expresión del represor floral *FLC* (Michaels, 2009). Por tanto, si *SHL* funcionara modulando los niveles de expresión de genes de la ruta autónoma o la actividad de ésta, las mutaciones en *SHL* provocarían cambios en los niveles de expresión de *FLC*. Por ese motivo, decidimos analizar los niveles de este represor floral en mutantes *shl-2*, tanto en un fondo genético *Ler*, con niveles bajos de *FLC*, como en uno portador de una mutación *fve-1*, que provoca un aumento en los niveles de expresión de este represor floral. En ninguno de los dos casos se observaron cambios significativos en la expresión de *FLC* como consecuencia de la pérdida de función de *SHL* (Fig. 32 B). Asimismo, tampoco observamos cambios en la expresión de *FVE* en los mutantes *shl-2* con respecto al ecotipo silvestre *Ler* (Fig. 32 A), lo cual parece indicar que *SHL* no actuaría regulando negativamente la ruta autónoma de inducción de la floración.

EBS es necesario para reprimir la expresión del integrador floral *FT* (Piñeiro et al., 2003), y las mutaciones en *FT* suprimen totalmente el fenotipo temprano de los mutantes *ebs* (Gómez-Mena et al., 2001). Puesto que *SHL* parece tener funciones parcialmente redundantes

con *EBS*, decidimos comprobar si *SHL* está también implicado en el control de los integradores florales en *Arabidopsis*. Para ello, generamos dobles mutantes que combinan *shl-2* y los mutantes *ft-1* y *soc1-1*. El tiempo de floración del doble mutante *shl-2 ft-1* es intermedio entre el de los mutantes sencillos *shl-2* y *ft-1* tanto en condiciones de DL como en DC (Fig. 24 y 26), por lo que, a diferencia de lo que ocurre con el mutante *ebs*, el fenotipo temprano de los mutantes *shl-2* es al menos parcialmente independiente de *FT*. Sin embargo, al analizar el tiempo de floración del doble mutante *shl-2 soc1-1*, pudimos observar una clara relación de epistasia entre ambas mutaciones, ya que el doble mutante *shl-2 soc1-1* florece con el mismo número de hojas que el mutante sencillo *soc1-1* en ambas condiciones de fotoperiodo (Fig. 25 y 26). Los datos genéticos anteriores fueron completados con un análisis de expresión de *FT* y *SOC1* en *shl-2* con respecto a *Ler* y *ebs*. De acuerdo con trabajos previos (Piñeiro et al., 2003), en los mutantes *ebs* detectamos un aumento en la expresión de *FT*, pero los niveles en el mutante *shl-2* son similares a los del tipo silvestre (Fig. 34 y 35). En cambio, sólo en los mutantes *shl-2* detectamos un aumento prematuro en la expresión de *SOC1* (Fig. 37). Por lo tanto, mientras que *EBS* se requiere para la represión de *FT* (Piñeiro et al., 2003), *SHL* sería necesario para reprimir la expresión del integrador floral *SOC1* (Fig. 37). Aunque existe cierta redundancia funcional entre *EBS* y *SHL* para el control del inicio de la floración, estos resultados indican que ambos también llevan a cabo funciones independientes en el control de la expresión de los integradores florales.

El tiempo de floración observado para los triples mutantes *shl-2 ebs ft-1* y *shl-2 ebs soc1-1*, es consistente con los datos anteriores, ya que en ambos casos el fenotipo de floración del triple mutante es intermedio entre el del doble mutante *shl-2 ebs* y los de *ft-1* y *soc1-1* respectivamente, lo que indica que las mutaciones en *FT* y *SOC1* no son suficientes para suprimir totalmente el fenotipo temprano del doble mutante *shl-2 ebs* (Fig. 27 y 28). Asimismo, analizamos la expresión de *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *shl-2 ebs*, y en ambos casos observamos un incremento mayor en la expresión de ambos integradores florales en los dobles mutantes que en los mutantes sencillos (Fig. 38). Este resultado pone de nuevo de manifiesto la existencia de una cierta redundancia funcional entre *EBS* y *SHL*, puesto que la falta de ambos genes provoca una desregulación mayor en la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* que la observada en los mutantes sencillos.

Estas observaciones relativas al efecto de la mutación *shl-2* sobre la expresión del integrador floral *SOC1* podrían explicar el fuerte retraso que provocan los mutantes en los genes de la ruta autónoma sobre el fenotipo de floración temprana de los mutantes *shl-2*. Mutantes de la ruta autónoma como *fve-1* y *fca-1* provocan un aumento de la expresión de

FLC (Michaels, 2009). Puesto que este represor floral actúa reprimiendo la expresión de *SOC1*, el efecto de la mutación *shl-2* podría verse enmascarado por los altos niveles de *FLC* en las plantas dobles mutantes, en las que la desregulación de *SOC1* causada por la pérdida de función de *SHL* tendría un efecto moderado sobre el retraso considerable que produce *FLC* sobre el tiempo de floración. Futuros experimentos dirigidos a establecer los niveles de *SOC1* en los dobles mutantes *shl-2 fve-1* y *shl-2 fca-1* nos permitirán examinar esta hipótesis.

Nuestros resultados relativos a la regulación de *SOC1* por *SHL* son consistentes con observaciones previas obtenidas a través del estudio de plantas transgénicas con niveles de expresión de *SHL* alterados, y que sugerían un papel para este locus en la regulación del integrador floral *SOC1* (Müssig y Altman, 2003). Análisis transcriptómicos globales llevados a cabo con plantas 35S::*SHL* indicaron que *SOC1* se encontraba sobrepresado en estas líneas, lo que podría explicar el fenotipo temprano que se observó en las plantas 35S::*SHL* (Müssig y Altman, 2003). Por el contrario, los resultados obtenidos previamente con plantas antisentido para *SHL* (α *SHL*) (Müssig et al., 2000) contrastan en algunos aspectos con nuestras observaciones. Dichas líneas α *SHL* exhiben también una desregulación de *SOC1*, aunque en este caso muestran una disminución moderada de sus niveles de expresión. Además, a diferencia de los mutantes *shl-2*, estas plantas α *SHL* presentan un retraso en la floración (Müssig et al., 2000; Müssig y Altman, 2003). Estas observaciones podrían deberse a que dichas líneas antisentido tengan afectada la expresión de otros genes que presenten homología con *SHL* o con algunos de sus dominios. Por otro lado, el fenotipo de tiempo de floración observado para las líneas de sobreexpresión por Müssig y Altman, 2003 es consistente con el de plantas 35S::*EBS*, ya que en ambos casos se observa una aceleración de la floración (Piñeiro et al., 2003). La arquitectura funcional de las proteínas EBS y SHL indica que no dispondrían de dominios capaces de unirse directamente al DNA, y que modularían la expresión de sus genes diana a través de su interacción con otras proteínas que formen parte de complejos remodeladores de cromatina. La sobreexpresión de estas proteínas podría alterar la estequiometría, provocando defectos en la composición, organización o regulación de dichos complejos y por lo tanto un efecto similar al resultante de la pérdida de función (Piñeiro et al., 2003). La generación futura de líneas transgénicas de *Arabidopsis* portadoras de construcciones en las que *EBS* y *SHL* se expresen acopladas a epítomos heterólogos permitirá abordar el estudio de cuáles son esas proteínas que estarían interaccionando in vivo con EBS y SHL para modular la expresión de los integradores florales. Alternativamente, el fondo genético empleado podría modificar el efecto que tiene la manipulación de los niveles de expresión de *SHL*. Mientras que los alelos de inserción analizados se encuentran en accesiones

de floración muy temprana, las líneas αSHL se generaron en un fondo C24, significativamente más tardío que *Ler* y *Col*. Consistente con esta hipótesis, el efecto de la mutación *shl-2* en un fondo genético *Col* es significativamente menor que en el fondo *Ler* (Fig. 17).

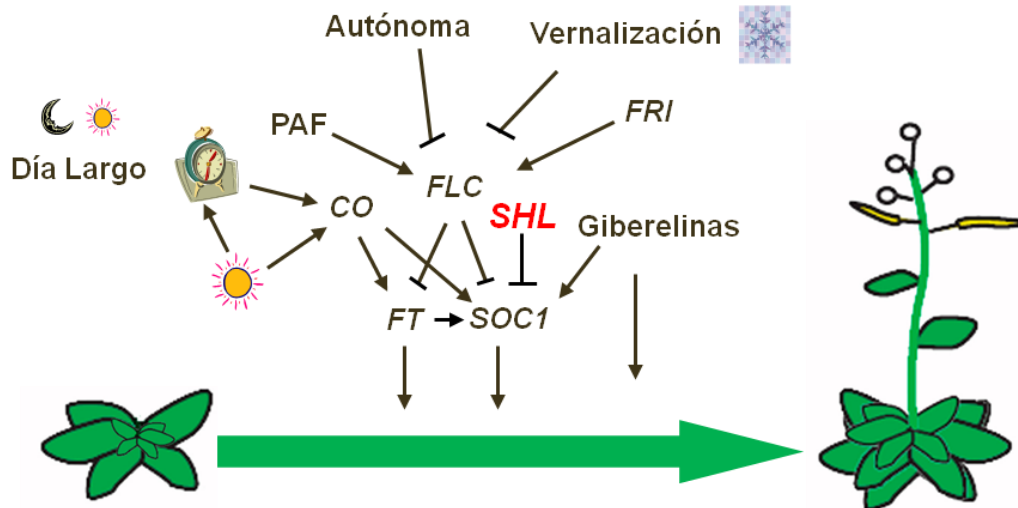


Fig 51. Modelo hipotético del papel ejercido por *SHL* en el control del tiempo de floración. Los análisis llevados a cabo en este trabajo indican que *SHL* sería necesario para reprimir la expresión del integrador floral *SOC1* a nivel transcripcional.

2. Interacción de *EBS* y *SHL* con otros remodeladores de cromatina de *Arabidopsis*.

Puesto que la composición de dominios funcionales de las proteínas *EBS* y *SHL* sugieren su implicación en procesos relacionados con la dinámica estructural de la cromatina, decidimos analizar también la relación genética entre *EBS* y *SHL* con otros genes implicados en procesos de remodelación de cromatina y que actúan reprimiendo la transición floral, como *CLF* y *TFL2*. *CLF* forma parte de un complejo polycomb PRC2 y durante la fase de desarrollo vegetativo reprime la expresión del integrador floral *FT*, mediando la incorporación de la marca H3K27me3 en su cromatina (Jiang et al., 2008). Los dobles mutantes *ebc clf-16* tienen un fenotipo de floración muy extremo especialmente en condiciones no inductivas de DC; además el fenotipo del doble mutante muestra alteraciones pleiotrópicas del desarrollo, con una reducción acentuada tanto del tamaño de los órganos aéreos como de la fertilidad de la planta (Fig. 40). Los niveles de expresión de *FT* son mayores en el doble mutante *ebc clf-16* que en los mutantes sencillos, lo que apoya la idea de que ambos loci interaccionen sinérgicamente en el control del tiempo de floración. Algo similar ocurre con el integrador floral *SOC1*, cuya expresión es mayor en el doble mutante *ebc clf-16* que en *clf-16*, debido posiblemente a la contribución de ambas mutaciones (Fig. 41). La falta de función de ambos represores podría

causar una desorganización a nivel de la cromatina de los integradores florales, y en particular de *FT*, que resulta en altos niveles de expresión de ese gen en estadios de desarrollo tempranos y por tanto en un inicio de la floración extremadamente prematuro. Asimismo, otros genes implicados en el control de diversos aspectos del desarrollo estarían también severamente desregulados, lo que provoca probablemente las alteraciones pleiotrópicas del desarrollo observadas en los dobles mutantes.

Por su parte, el análisis del doble mutante *shl-2 clf-16* indica una clara epistasia de *clf-16* sobre *shl-2* puesto que el tiempo de floración del doble mutante es similar al del mutante *clf-16* en ambas condiciones de fotoperiodo ensayadas, lo que sugiere que en ausencia de *CLF* funcional, la mutación *shl-2* no tiene ningún efecto sobre el tiempo de floración (Fig. 39). En este caso, la expresión de los integradores florales en el doble mutante *shl-2 clf-16* es solo ligeramente superior a la observada en el mutante *clf-16*, y no se traduce en una mayor aceleración de la floración en el doble mutante *shl-2 clf-16* (Fig. 41).

Estos resultados muestran nuevamente que la interacción de *EBS* y *SHL* con otros loci implicados en la regulación de la transición floral en *Arabidopsis* es diferente, y corroboran de nuevo que aunque *EBS* y *SHL* tienen cierta redundancia funcional, también desempeñan funciones independientes en el control del tiempo de floración.

TFL2/LHP1 reprime la transcripción de numerosos genes incluyendo a *FT* (Kotake et al., 2003; Turck et al., 2007). Se ha propuesto que *TFL2/LHP1* se une a la marca H3K27me3 previamente depositada en la cromatina por el complejo *PRC2*, manteniendo el estado reprimido de sus genes diana (Turck et al., 2007).

Los dobles mutantes *shl-2 tfl2-1* y *eps tfl2-1* presentan un tiempo de floración más temprano que los mutantes sencillos, y alteraciones pleiotrópicas de diversos aspectos del fenotipo, con una reducción muy significativa del porte y la fertilidad de la planta, especialmente en el caso de *eps tfl2-1* (Fig. 42 y 43). Estos resultados junto con los datos moleculares obtenidos, donde se observa un aumento en la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* en los dobles mutantes *eps tfl2-1* y *shl-2 tfl2-1*, sugieren nuevamente un sinergismo entre los loci *EBS* y *SHL* con *TFL2/LHP1* para el control del tiempo de floración (Fig. 44). Estos datos son consistentes con la hipótesis de que *EBS* y *SHL* estén implicados en procesos de regulación de la expresión génica a través de la modulación de la organización de la cromatina. Las plantas dobles mutantes que carecen de los mecanismos de represión mediados por estas proteínas (*EBS* o *SHL* por un lado, *CLF* o *TFL2* por otro) muestran una desregulación severa de los integradores florales en estadios muy tempranos del desarrollo.

Esto podría deberse a una desorganización de la cromatina de estos loci que conduce a la pérdida de la conformación inactiva en transcripción que deberían presentar los integradores florales en los estadios iniciales del crecimiento de la planta de *Arabidopsis*. La relajación de esta estructura no permisiva facilitaría la expresión temprana de dichos genes, provocando una reducción drástica de la fase de crecimiento vegetativo en estas plantas dobles mutantes. La activación de otros genes a lo largo de distintos estadios de desarrollo sería responsable de las alteraciones pleiotrópicas del fenotipo observadas en estos dobles mutantes.

Será de gran interés caracterizar en mayor profundidad los mecanismos represores de la transcripción en los que participan estas proteínas y establecer como interaccionan entre sí para modular con precisión el estado transcripcional de la cromatina de genes maestros del desarrollo como *FT* y *SOC1*. Los datos que hemos obtenido hasta el momento indican que EBS y TFL2 no interaccionan físicamente en ensayos de doble híbrido en levadura (datos no mostrados). Sin embargo, esto no nos permite descartar que en el entorno de la cromatina de *Arabidopsis*, estas proteínas puedan formar parte de complejos de orden superior implicados en regular la expresión de genes de tiempo de floración.

3. Caracterización de la función bioquímica de las proteínas EBS y SHL.

La presencia de dominios BAH y PHD en EBS y SHL sugiere que ambas proteínas podrían estar formando parte de complejos que participan en la modulación de la dinámica estructural de la cromatina (Callebaut et al., 1999; Palacios et al., 2008; Champagne et al., 2008; Champagne y Kutateladze, 2009). A partir de estudios estructurales se ha propuesto que los residuos del extremo N-terminal de las histonas quedan accesibles en los nucleosomas y pueden interaccionar con otras proteínas, incluyendo otras histonas. Además determinados residuos del extremo N-terminal de las histonas son susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales como son la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación (Bhaumik et al., 2007; Kouzarides et al., 2007). Las histonas se metilan en residuos de arginina (R) o lisina (K) (Sims et al., 2003; Shilatifard, 2006) y en concreto, las K se metilan por la actividad de enzimas que se denominan lisina metiltransferasas (KMTs) que pueden o no contener un dominio SET (Kouzarides, 2002). Los residuos K también pueden ser acetilados y ambas marcas suelen ser mutuamente excluyentes (Shilatifard, 2006). La acetilación se asocia típicamente con activación transcripcional o un estado de la cromatina “relajado”, mientras que la metilación puede asociarse tanto a activación como a represión transcripcional, dependiendo del residuo metilado (Shilatifard, 2006). La combinación de modificaciones covalentes presentes en los extremos amino terminales de las histonas contribuye a establecer

estados funcionales en regiones discretas de la cromatina. Sin embargo, estas modificaciones postraduccionales de las histonas no son responsables por sí mismas de cambios estructurales en la cromatina que puedan explicar el efecto que tienen sobre la transcripción de los genes subyacentes. Son determinadas proteínas o dominios funcionales de éstas los encargados de reconocer específicamente residuos de histonas modificados y traducir este código en patrones de expresión génica. Por tanto, estas proteínas efectoras tienen un papel central en definir las consecuencias funcionales de las modificaciones que sufren las histonas.

La trimetilación en H3K4 es una marca de activación transcripcional altamente conservada en todos los organismos eucariotas desde levaduras a humanos. Uno de los primeros complejos de metilación de H3K4 identificados fue el complejo COMPASS en *Saccharomyces cerevisiae*. Dicho complejo es capaz de mono, di y trimetilar a H3K4 (Miller et al., 2001; Nagy et al., 2002; Schneider et al., 2005; Shilatifard, 2006; Wood et al., 2007). En mamíferos, se identificaron las proteínas denominadas MLL como los homólogos del complejo COMPASS (Hughes et al., 2004; Tenney y Shilatifard, 2005; Shilatifard, 2006). Se ha descrito que esta modificación postraducciona se localiza en sitios puntuales cercanos al inicio de la transcripción (Krogan et al., 2003; Ng et al., 2003) y que la monoubiquitinación de H2B es un prerrequisito para que se produzca tanto la H3K4me₂ como la H3K4me₃ (Dover et al., 2002; Sun y Allis, 2002; Shilatifard, 2006), regulando el ensamblaje preciso de las distintas subunidades del complejo COMPASS, y por lo tanto, la correcta metilación de H3K4 (Lee et al., 2007).

Las histonas metiladas en la K4 son reconocidas de manera específica por unas proteínas que frecuentemente son portadoras de un dominio PHD, que se asocia directamente con la H3K4 di y trimetilada (Pray-Grant et al., 2005; Sims et al., 2005; Shi et al., 2006; Wysocka et al., 2006; Shi et al., 2007). Entre ellas se han descrito las proteínas de humanos portadoras de un dominio PHD, como ING2, ING4, ING5, RAG2 y BPTF (Pray-Grant et al., 2005; Sims et al., 2005; Shi et al., 2006; Wysocka et al., 2006; Shi et al., 2007). Estudios recientes han demostrado además que el complejo de transcripción TFIID de humanos también se une directamente a la marca H3K4me₃ a través del dominio PHD de TAF3 (Vermeulen et al., 2007).

En *Arabidopsis* se han identificado 83 proteínas con un dominio PHD según la predicción de los programas SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) y Pfam prediction (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), y una gran parte de ellas se recogen en la tabla 7. Entre estas se encuentran además de EBS y SHL, los homólogos de las proteínas ING de humanos, denominados AtING (Soleiman y Riabowol, 2007) y las proteínas Alfin 1-like (AL) (Bastola et al.,

1998; Winicov y Bastola, 1999; Winicov, 2000), cuyos dominios PHD son muy similares a los de la proteína de humanos ING2 y al del factor de transcripción BPTF. Si bien las proteínas ING están presentes en levaduras, animales y plantas, las proteínas AL sólo existen en plantas (Lee et al., 2009). Experimentos realizados in vitro indican que los dominios PHD de las proteínas AtING y AL de Arabidopsis se unen a H3K4me3 y también con menor afinidad a H3K4me2 (Lee et al., 2009). Recientemente se ha descrito que la proteína ORC1 de Arabidopsis, también reconoce a H3K4me3, y se ha propuesto que AtORC1 funciona como un activador transcripcional que se uniría a través de su dominio PHD a la marca H3K4me3 en los genes diana y promovería la acetilación de H4 y la trimetilación de H4K20 en sus regiones promotoras (Sánchez y Gutierrez, 2009).

ORF	NOMBRE	Nº PHD	OTROS DOMINIOS	ORF	NOMBRE	Nº PHD	OTROS DOMINIOS
At1g05380.1		1	GNAT	At3g19510.1	HAT3.1	1	Homeobox
At1g05830.1	SDG30	ATX2	LBR_tudor, PWWP, FYRN, FYRC, SET	At3g20280.1		1	
At1g14510.1		1		At3g24010.1	INGF1	1	Borrelia_P83
At1g32810.2		1		At3g42790.1		1	
At1g33420.1		1		At3g51120.1		1	SWIB, Plus-3, GYF, zf-CCCH
At1g43770.1		1		At3g52100.1		2	zf-C3HC4
At1g50620.1		1		At3g53680.1		1	LsmAD
At1g54390.3	INGF2			At3g61740.1	SDG14	2	PWWP, SAND, SET
At1g63490.1	JMJ17		JmjC, zf-C5HC2, PLU-1	At4g10600.1		1	
At1g66170.1		MMD1		At4g10940.1		1	zf-C3HC4
At1g67220.1	HAC2	HAC2	DUF906, HRDC, ZZ, zf-TAZ	At4g12620.1	ORC1B	1	BAH, AAA
At1g68030.1		1		At4g14700.1	ORC1A	1	BAH, AAA
At1g77250.1		3		At4g14920.1		1	
At1g77800.1		2	PeptidaseC6	At4g22140.2	EBP1	EBS	BAH
At1g79350.1		1	YABBY, ResII, HelicaseC	At4g27910.1	SDG16	2	PWWP, Baculo_LEF5, SET
At2g01810.1		1		At4g29940.1	PRHA	1	Homeobox
At2g02470.1		1		At4g39100.1	EBP3	SHL1	BAH
At2g18090.1		1	SWIB, GYF	At5g05610.1		1	
At2g19260.1		1	ELM2	At5g09790.2	SDG15	ATXR5	SET
At2g25170.1	CHR6	PKL	Chromo, SNF2N, HelicaseC, DUF1087, DUF1086, CHDCT2, POTRA_2	At5g12400.1		1	DDT, AT_hook
At2g31650.1	SDG27	ATX1	LBR_tudor, PWWP, FYRN, FYRC, SET	At5g15540.1		1	
At2g36720.1		2		At5g16680.1		1	
At2g37520.1		1		At5g20510.1		1	
At2g40770.1	CHR36		SNF2N, TPR_2, zf-C3HC4, HelicaseC	At5g22260.1	MS1	1	Zfx_Zfy_act
At3g01460.1	MBD9	MBD9	MBD, FYRN, FYRC, CbIZ	At5g22760.1		2	DDT, DUF1356, C1_3
At3g02890.1		1		At5g24330.1	SDG34	ATXR6	SET
At3g05670.1		1	zf-C3HC4	At5g26210.1		1	
At3g08020.1		2		At5g35210.2		2	LBR_tudor, DDT
At3g11200.1		1		At5g36670.1		1	AT_hook, AcTf1, HCV_NS5a
At3g12980.1	HAC5	HAC5	zf-TAZ, DUF906, ZZ, Topo-VIb_trans	At5g36740.1		1	AT_hook, AcTf1
At3g14740.2		1		At5g44800.1	CHR4	CHR4	Chromo, SNF2N, HelicaseC, DUF1087
At3g14980.1		1	zf-C3HC4, AcTf1	At5g53430.1	SDG29	ATX5, SET29	PWWP, Spt4, Baculo_LEF5, SET
				At5g55390.1		EDM2	C1_1, Eco57I
				At5g57380.1	VPGB1	VIN3	fn3
				At5g58610.1		1	Agenet, AcTf1
				At5g60410.4	AtSIZ1	1	SAP, zf-MIZ
				At5g63700.1		1	SWIB, Plus-3
				At5g63900.1		1	AcTf1

Tabla 7. Proteínas de Arabidopsis con dominios PHD canónicos. Adaptada de Lee et al., 2009.

Puesto que las proteínas EBS y SHL contienen un dominio PHD con los residuos esenciales de este motivo para el reconocimiento de H3K4me3, decidimos examinar la capacidad de las proteínas EBS y SHL así como de sus dominios PHD, para interactuar con las distintas formas metiladas del residuo K4 de la histona H3. Para abordar esta cuestión, llevamos a cabo dos estrategias complementarias. Por un lado, realizamos experimentos de

unión de los dominios PHD de ambas proteínas a péptidos biotinilados de H3 modificados en el residuo K4, y por otro, realizamos un experimento de unión de las proteínas EBS y SHL completas y de los dominios PHD de ambas, a un extracto de histonas de células de *Arabidopsis* en cultivo (MM2d) (Fujiyama et al., 2002). Con ambas aproximaciones comprobamos que tanto las proteínas completas como los dominios PHD de EBS y SHL interaccionan con H3K4me3/2 (Fig. 46 y 47). También hemos generado formas mutadas de los dominios PHD, donde se sustituyó el residuo W170 de EBS y el 163 de SHL, por el aminoácido A. La elección de este residuo de W no fue aleatoria, sino que se escogió porque resultados previos mostraban que en el caso del dominio PHD de la proteína ING1, los residuos aromáticos Y212 y W235 junto a los residuos hidrofóbicos M223 y S219 forman una cavidad que es responsable de la interacción de dicha proteína con H3K4me3 (Champagne y Kutateladze, 2009). Tanto los residuos aromáticos como los residuos hidrofóbicos mencionados son esenciales para dicha interacción puesto que la sustitución de alguno de ellos impide la interacción del dominio PHD con H3K4me3 (Champagne y Kutateladze, 2009). Se ha propuesto que las cadenas aromáticas de los residuos Y212 y W235 se colocan perpendicularmente una a la otra y a la superficie de la proteína, estableciendo uniones de tipo catión- π , hidrofóbicas y de van der Waals con la H3K4me3. La metilación en los residuos de K favorece este tipo de interacciones con los residuos aromáticos, particularmente el W, debido a que aumentan los contactos hidrofóbicos entre la cadena aromática del W y los grupos metilo de K (Hughes et al., 2007). Estas versiones modificadas del dominio PHD de EBS y SHL (EBS_{W170A} y SHL_{W163A}) son incapaces de interaccionar con H3K4me2/3 (Fig. 46 y 47), lo que sugiere que la unión de los motivos PHD de EBS y SHL con esta histona modificada tiene lugar de forma específica. Estas observaciones nos llevaron a concluir que EBS y SHL reconocen las formas di y trimetiladas de H3K4 a través de su dominio PHD, y que el residuo W170 en EBS y 163 en SHL, serían esenciales para dicho reconocimiento y para la especificidad de la interacción.

En los experimentos de unión de los dominios PHD de EBS y SHL a los péptidos de histona H3 modificados en el residuo K4, detectamos unión de EBS-PHD y SHL-PHD a las formas di y trimetiladas de la K4H3, siendo ligeramente superior la afinidad observada por la forma dimetilada en ambos casos (Fig. 46). Este resultado es similar al observado en el caso del dominio PHD de la proteína Pygopus (Pygo), que interacciona por igual con las formas di y trimetiladas (Fiedler et al., 2008). Se ha propuesto que la alta afinidad de Pygo por las formas di y trimetiladas se debe al residuo D 352 situado en una de las paredes que conforman la cavidad aromática formada por el dominio PHD. La cadena carboxílica de D352 da lugar a una

unión de hidrógeno con el protón dimetilamonio de K4, incrementando la afinidad hacia la forma H3K4me2 (Champagne y Kutateladze, 2009). Por lo tanto, la afinidad por la forma dimetilada de K4 podría estar relacionada con la presencia de un residuo ácido en la cavidad aromática del PHD. Esta hipótesis es consistente con observaciones obtenidas para el PHD del factor de transcripción BPTF. La sustitución de un residuo de tirosina (Y) por un residuo de glutámico (E) en el dominio PHD de esta proteína causa un aumento de la afinidad por la forma dimetilada de H3K4 (Li et al., 2007). En el caso de los dominios PHD de las proteínas EBS y SHL, la cavidad aromática tiene además de los residuos de W y de Y, dos residuos D en posición 152 y 153 en EBS, y en posición 158 y 159 en el caso de la proteína SHL, lo cual podría explicar su mayor afinidad por la forma dimetilada de H3K4.

Como ya se comentó anteriormente el dominio BAH está presente en proteínas, desde levaduras a humanos, asociadas a la cromatina (Nicolas y Goodwin, 1996). En concreto, la subunidad Orc1 del complejo del Origen de Replicación, las subunidades Rsc1 y Rsc2 del complejo remodelador de cromatina RSC, la metiltransferasa de DNA de mamíferos DNMT1 y la subunidad Mta1 del complejo deacetilasa de histonas NURD de mamíferos contienen dominios BAH (Nicolas y Goodwin, 1996). En el caso de la proteína Orc1, el dominio BAH es imprescindible para la asociación estable de ORC con los cromosomas de levaduras, y por lo tanto para el proceso de la replicación del DNA (Noguchi et al., 2006), siendo esta función del dominio BAH independiente de la que lleva a cabo en el silenciamiento génico (Connelly et al., 2006). El dominio BAH de Orc1 contribuye a la asociación del complejo ORC con la mayoría de los orígenes de replicación en levaduras (Müller et al., 2010). Un dominio BAH también está presente en la proteína Sir3p, necesaria para el ensamblaje de la cromatina de los telómeros y de los loci denominados cryptic HM mating-type loci de *S. cerevisiae*. Sir3 forma parte del complejo SIR constituido por las subunidades Sir2, Sir3 y Sir4 de levaduras, e interacciona con residuos K sin modificar de H4 y con el dominio globular de H3. Por lo tanto, es posible que el dominio BAH de las proteínas EBS y SHL reconozca modificaciones epigenéticas o incluso las zonas globulares de las histonas. Será necesario por lo tanto llevar a cabo más experimentos en el futuro que nos permitan concretar el papel funcional del dominio BAH en las proteínas EBS y SHL.

Los dominios funcionales presentes en EBS y SHL y su capacidad de reconocer H3K4me2/3 sugiere que estas proteínas podrían funcionar como efectores que se unen a dichas modificaciones en la cromatina de sus genes diana y reclutan a otros complejos proteicos implicados en procesos de remodelación de cromatina para modular la expresión de los genes subyacentes. Una posible relación entre proteínas que contienen un dominio PHD y

complejos HDAC ya se había propuesto previamente en el caso de las proteínas de la familia ING de humanos (Champagne y Kutateladze, 2009). Las proteínas de la familia ING en humanos se dividen en tres grupos en función de su asociación a tres complejos enzimáticos diferentes. Las del primer grupo, formado por ING1 y 2, se asocian con el complejo HISTONE DEACETYLASE COMPLEX (HDAC) Sin3A/HDAC1/2 (Skowrya et al., 2001; Kuzmichev et al., 2002; Doyon et al., 2006). Por su parte ING3 es un componente del complejo HISTONE ACETYL TRANSFERASE (HAT) NuA4/Tip60 y se requiere para la acetilación de las histonas H4 y H2A.Z (Doyon et al., 2004; Doyon et al., 2006). Por último, ING4 e ING5 son dos subunidades de los complejos HAT MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein)/MORF (Moz-related factor) y HBO1 (Kuzmichev et al., 2002). En plantas, el complejo PHD-PRC2 del que forma parte VIN3, participa en la represión de *FLC* durante el tratamiento de vernalización. La ausencia de las proteínas VIN3, VRN5 y VEL1 provoca una reducción en la distribución de H3K27me3 a lo largo de la cromatina de *FLC* y por lo tanto de la represión estable del gen (de Lucía et al., 2008). Otro ejemplo de proteína con dominio PHD que reconoce H3K4me3 y modifica el estado de la cromatina del gen diana es ORC1, como se comentó anteriormente.

La acetilación de las histonas es un mecanismo que se relaciona directamente con el inicio y la elongación de la transcripción génica (Adrian et al., 2010) y se localiza principalmente en los promotores y en las regiones 5' de los genes (Choi y Howe, 2009). En *Arabidopsis*, la transcripción de los genes *TOC1* y *FLC* es un ejemplo de regulación transcripcional mediada por el estado de acetilación de los mismos (Perales y Mas, 2007; Farrona et al., 2008). En el locus *FT* se han descrito regiones hiperacetiladas en dos zonas del promotor del gen, una distal y otra proximal, lo que indica que dichas regiones podrían tener una estructura cromatínica similar que facilitarían la expresión de *FT* (Adrian et al., 2010).

Con estos resultados previos y puesto que EBS y SHL son necesarios para reprimir la expresión de *FT* y *SOC1* respectivamente, es posible que el mecanismo represor en el que participan estas proteínas implique la unión a la marca H3K4me2/3 en la cromatina de *FT* y de *SOC1*, reclutando a otra/s proteína/s que a su vez modifiquen el estado de acetilación de la cromatina de dichos integradores florales. De hecho, en experimentos de CHIP hemos observado cambios en los niveles de acetilación en ciertas regiones de la cromatina de los genes *FT* y *SOC1* en los mutantes *ebs* y *shl-2* respectivamente, pero no de otras modificaciones de las histonas (H3K27me3 y H3K4me3), lo que sugiere que EBS y SHL interaccionarían con complejos remodeladores que modulan el nivel de acetilación de histonas (Fig. 48 y 49). En concreto, en la cromatina del integrador floral *SOC1*, detectamos 3 regiones genómicas que presentan unos niveles de acetilación más elevados en el mutante *shl-2* que en la cepa

silvestre *Ler*, mientras que otras modificaciones postraduccionales de las histonas como H3K4me3 y H3K27me3 no están alteradas. Dichas zonas de *SOC1*, denominadas II, III y IV, son las mismas en las que se detectaban cambios tanto de acetilación (H3K9Ac) como de metilación (H3K4me2) en los mutantes *msi-tap* asociados a cambios en los niveles de expresión de *SOC1* (Hennig et al., 2006), lo que sugiere que estas regiones de la cromatina de *SOC1* están sometidas a modificaciones postraduccionales que son esenciales en la regulación de la expresión del gen. Estos datos concuerdan con nuestra hipótesis de que la proteína SHL, al reconocer las marcas epigenéticas H3K4me3/2 en el locus *SOC1*, pudiera reclutar a proteínas o complejos proteicos con actividad deacetilasa que modificasen el estado de acetilación de las regiones II, III y IV de la cromatina de *SOC1*, reprimiendo su expresión. Estos resultados confirman la importancia de los procesos de remodelación de cromatina en la regulación transcripcional del integrador floral *SOC1*, un aspecto del control de la floración del que se disponen de escasos datos.

Varios represores transcripcionales participan directamente en la regulación de la expresión de *FT* en la hoja (Adrian et al., 2010). Así, FLC y SVP forman un complejo que se asocia con zonas tanto del promotor como del primer intrón de *FT* (Searle et al., 2006; Li et al., 2008). Además miembros de dos subfamilias de factores de transcripción de tipo AP2 también interaccionan directamente con *FT* y participan en su represión transcripcional. Así, TEM1 y TEM2 son miembros de la familia de proteínas RAV y contienen dos dominios de unión a DNA, un dominio AP2/ERF y otro B3 (Castillejo y Pelaz, 2008). TEM1 y TEM2 son parcialmente redundantes, ya que sólo la ausencia de ambos genes provoca un fenotipo claro de floración temprana, mientras que la expresión constitutiva de cada uno de ellos conlleva un retraso en la floración (Castillejo y Pelaz, 2008). Además, el fenotipo tardío de las plantas 35S::TEM se suprime por 35S::FT y no por 35S::CO, y los niveles de expresión de *FT* están aumentados en las plantas RNAi-TEM1/2 (Castillejo y Pelaz, 2008). Por último, se ha demostrado que TEM1 se une directamente a la región 5' UTR del locus *FT* a través de su dominio RAV, lo que indicaría que CO y TEM compiten en la activación transcripcional de *FT* (Castillejo y Pelaz, 2008). Otro represor de la expresión de *FT* es SCHAFFMÜTZE (*SMZ*), que codifica una proteína de la familia de proteínas AP2, que es regulada negativamente por miR172 (Aukerman y Sakai, 2003). La sobreexpresión de *SMZ* reprime la expresión de *FT* mientras que la sobreexpresión de miR172 acelera la transición floral de forma parcialmente dependiente de *FT*. *SMZ* se une varias kilobases aguas abajo de la secuencia codificante de *FT* (Mathieu et al., 2009).

Además de todos esos factores de transcripción que se unen a regiones reguladoras de *FT*, diversos complejos remodeladores de la estructura de la cromatina participan de forma

decisiva en el control transcripcional de este integrador floral, añadiendo otro nivel de complejidad a su regulación (Adrian et al., 2010). Por ejemplo, tanto la proteína LHP1 como la marca H3K27me3 están ampliamente distribuidas en el locus *FT*, lo que indica que este gen está también regulado por las proteínas del grupo Polycomb (Turck et al., 2007; Zhang et al., 2007b). También las proteínas ELF6 y ATJMJ4 se unen a la región de inicio de la transcripción del locus *FT* y actúan eliminando la metilación de residuos de H3K4 para mantener la cromatina en un estado transcripcionalmente inactivo y evitar la floración precoz (Jeong et al., 2009).

Al igual que en el caso de *SOC1*, en nuestros experimentos de ChIP hemos encontrado regiones de la cromatina del locus *FT* que se encuentran hiperacetiladas en el mutante *eps* (Fig. 49). En concreto, las zonas 5'UTR y el resto del primer exón muestran niveles más altos de H3K9K14Ac en el mutante que en el tipo silvestre. Estas regiones solapan significativamente con zonas que se encuentran hiperacetiladas en plantas de *Arabidopsis* que expresan constitutivamente *FT* y que son importantes para su activación (Adrian et al., 2010). Además en estas regiones los niveles de H3K27me3 y LHP1 son menores que en el resto del locus, y se ha propuesto que esto facilitaría la accesibilidad de activadores de *FT*, tales como CO (Adrian et al., 2010). A diferencia de lo que ocurre con la acetilación de H3K9K14, otras modificaciones de la cromatina del locus *FT* no se encuentran alteradas en los mutantes *eps* que muestran niveles similares de H3K4me3 y H3K27me3. Estos datos son consistentes con observaciones previas que han mostrado que los niveles de la marca inactiva H3K27me3 no siempre se correlacionan con los niveles de expresión de genes subyacentes; así, mientras que la sobreexpresión de *CO*, que activa la expresión de *FT*, provoca hiperacetilación de H3K9K14 y pérdida de LHP1, no altera los niveles de H3K27me3 (Adrian et al., 2010). Igualmente, en plantas portadoras de construcciones *AG::GUS* se obtiene actividad B-glucuronidasa incluso cuando el transgen está enriquecido en H3K27me3 (Schubert et al., 2006). Asimismo, en dos genes de respuesta al frío, *COR15A* y *ATGOLS3*, se ha observado que las cinéticas de activación en presencia de tratamientos de frío y de represión en temperaturas normales de crecimiento no corresponden con la dinámica de pérdida y de aumento de H3K27me3 (Kwon et al., 2009).

La zona 5'UTR de *FT* que se encuentra hiperacetilada en los mutantes *eps* es además la región donde se ha descrito la unión de las proteínas demetilasa de tipo *jmj* AtJmj4 y ELF6 (Jeong et al., 2009), así como de la proteína TEM1 (Castillejo y Pelaz, 2008), todo lo cual indica que ésta es una región esencial para la regulación transcripcional de *FT*. Asimismo, en esta secuencia que se encuentra inmediatamente aguas arriba del codón de inicio de la traducción hemos podido detectar la unión de la proteína EBS en experimentos de ChIP realizados con el anticuerpo α -EBS en líneas transgénicas *35S::EBS* (Fig. 50), lo que sugiere que EBS está

implicado en la represión del integrador floral *FT* interactuando directamente con estas regiones reguladoras. En base a estas observaciones nuestra hipótesis de trabajo es que la proteína EBS interaccionaría con la cromatina del locus *FT* reconociendo marcas epigenéticas como H3K4me3/2, posiblemente a través de su dominio PHD, que es capaz de unirse a estas modificaciones covalentes de las histonas in vitro. Posteriormente, EBS podría estar implicado en el reclutamiento de proteínas con actividad deacetilasa que redujesen los niveles de acetilación de histonas en zonas próximas al codón de iniciación del locus *FT*; esto contribuiría a mantener la cromatina de *FT* en un estado no permisivo que dificulte su transcripción. Este estado transcripcionalmente inactivo de la cromatina sería necesario durante los estadios iniciales del desarrollo de la planta de *Arabidopsis* para mantener apagado al integrador floral *FT* e impedir así el inicio prematuro de la floración. Esto posibilita una regulación rápida de estos genes y el establecimiento de un balance entre señales activadoras y represoras que permiten a la planta adaptar su desarrollo a las condiciones ambientales asegurando su éxito reproductivo. Nuestros resultados sugieren que SHL podría actuar de forma similar en la regulación de *SOC1*, aunque será necesario obtener datos que confirmen la unión de SHL a las regiones reguladoras de este integrador floral.

El mecanismo a través del cual ocurre este proceso así como cuales serían los complejos HDAC implicados no han sido desvelados hasta el momento y serán necesarios nuevos estudios para caracterizar este mecanismo represor que funciona evitando una activación prematura de los integradores florales y probablemente de otros reguladores centrales de diversos procesos de desarrollo.

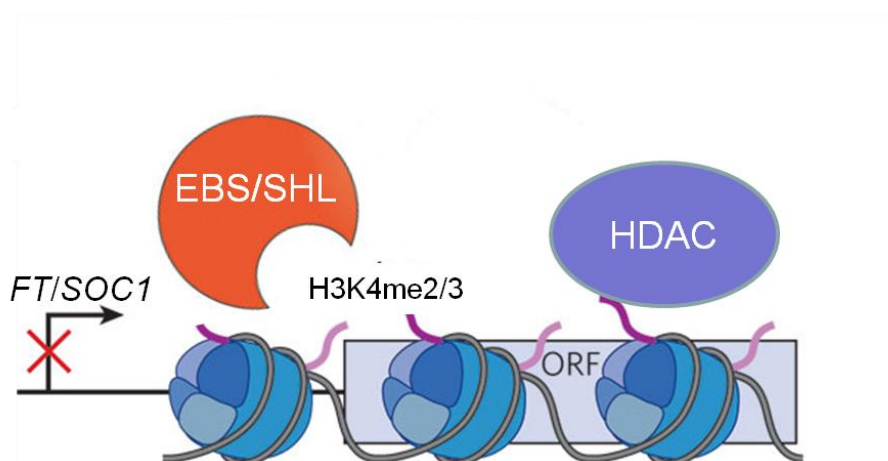


Fig 52. Modelo hipotético del papel que ejercen las proteínas EBS y SHL en la modulación de la dinámica estructural de la cromatina de los genes *FT* y *SOC1* respectivamente. Reconocimiento de H3K4me3/2 por parte del dominio PHD de la proteína EBS/SHL y posterior reclutamiento de un complejo HDAC que deacetila la cromatina de *FT/SOC1*.

Por lo tanto la caracterización de las proteínas EBS y SHL realizada en este trabajo, ha permitido revelar su posible función en la modulación de la dinámica estructural de la cromatina de los integradores florales *FT* y *SOC1* respectivamente. La regulación transcripcional de ambos genes desempeña un papel central en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*. Nuestros resultados sugieren que estos dos represores florales podrían actuar a través del reconocimiento de marcas epigenéticas en la cromatina de los integradores florales y el posterior reclutamiento de complejos tipo HDAC que participarían en el mantenimiento de una conformación cromatínica no permisiva para la expresión de estos genes y por lo tanto el mantenimiento del estado vegetativo de la planta. Asimismo, nos ha permitido avanzar considerablemente en la comprensión del mecanismo regulador mediado por estas proteínas específicas de plantas, cuya función a nivel molecular era totalmente desconocida.

CONCLUSIONES

Hemos abordado la caracterización funcional del gen *SHL* de *Arabidopsis*, que codifica una proteína relacionada con factores de remodelación de cromatina y con una arquitectura modular específica de plantas, y hemos analizado su papel en el control del tiempo de floración; asimismo, hemos llevado a cabo un análisis comparativo de la función de este locus y la de *EBS* en la regulación del desarrollo reproductivo de *Arabidopsis*, estudiando su posible redundancia funcional.

1. *SHL* muestra un patrón de expresión ubicuo, detectándose niveles similares de su mRNA en todos los órganos de la planta analizados; asimismo, *SHL* se expresa en todos los estadios de desarrollo estudiados.
2. El alelo *shl-2* que se encuentra en fondo genético *Ler* no presenta niveles detectables del mRNA de *SHL*, lo que indica que se trata de un alelo nulo. Por el contrario, la mutación *shl-1*, en fondo *Col*, da lugar a un mensajero truncado.
3. *SHL*, un locus que codifica una proteína con un dominio BAH y un dominio PHD, participa en el control del tiempo de floración, reprimiendo la transición floral; asimismo, también está implicado en la regulación de otros procesos de desarrollo.
4. *SHL* y su homólogo *EBS* desempeñan funciones parcialmente redundantes pero también funciones independientes en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*.
5. *SHL* no interacciona genéticamente con la ruta del fotoperiodo, la ruta autónoma o la ruta dependiente de giberelinas, ni con el integrador floral *FT*. En cambio, *SOC1* es epistático sobre *SHL* para el tiempo de floración, ya que las mutaciones en este integrador floral suprimen totalmente el fenotipo de floración temprana de mutantes de pérdida de función de *SHL*.
6. A diferencia de *EBS* que es necesario para reprimir la expresión de *FT*, *SHL* actúa reprimiendo la expresión de *SOC1*.
7. Tanto *EBS* como *SHL* interaccionan genéticamente con loci que codifican proteínas relacionadas con procesos de remodelación de cromatina tales como los represores transcripcionales *TFL2/LHP1* y *CLF*. *EBS* interacciona de forma sinérgica con ambos loci. *SHL* muestra también una interacción sinérgica con *TFL2*, mientras que *CLF* es epistático sobre *SHL*.
8. *EBS* y *SHL* reconocen in vitro las marcas epigenéticas H3K4me3/2, y el dominio PHD presente en ambas proteínas es el responsable de esta interacción.
9. Regiones discretas de la cromatina de los loci *FT* y *SOC1* se encuentran enriquecidas en histonas H3K9K14 acetiladas en los mutantes *ebs* y *shl-2* respectivamente, lo que

sugiere que EBS y SHL podrían estar implicados en el silenciamiento transcripcional mediante el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina relacionados con la desacetilación de histonas.

10. EBS interacciona directamente con regiones reguladoras próximas al ATG inicial del locus *FT*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasland R., Gibson TJ. y Stewart AF.** (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 20(2), 56-59.
- Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Notaguchi M., Goto K. y Araki T.** (2005a). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309(5737), 1052-1056.
- Achard P., Herr A., Baulcombe DC. y Harberd NP.** (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development.* 131(14), 3357-3365.
- Adrian J., Farrona S., Reimer JJ., Albani MC., 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(5), 1425-1440.
- Alexandre C.M. y Hennig L.** (2008). *FLC* or not *FLC*: the other side of vernalization. *J. Exp. Bot.* 59(6), 1127-1135.
- Alvarez-Venegas, R., Pien, S., Sadler, M., Witmer, X., Grossniklaus y Avramova, Z.** (2003). ATX1, an Arabidopsis homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr Biol.* 13, 627-637.
- Amasino R.** (2005). Vernalization and flowering time. *Curr Opin Biotechnol.* 16(2), 154-158.
- Amasino R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J.* 61(6), 1001-1013.
- Amasino RM. y Michaels SD.** (2010). The timing of flowering. *Plant Physiol.* 154(2), 516-520.
- An H., Roussot C., Suárez-López P., Corbesier L., Vincent C., Piñeiro M., Hepworth S., Mouradov A., Justin S., Turnbull C. y Coupland G.** (2004). *CONSTANS* acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development* 131, 3615–3626.
- Aukerman MJ., Hirschfeld M., Wester L., Weaver M., Clack T., Amasino RM. y Sharrock RA.** (1997). A deletion in the PHYD gene of the Arabidopsis Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell.* 9(8), 1317-26.
- Aukerman MJ., Lee I., Weigel D. y Amasino RM.** (1999). The Arabidopsis flowering-time gene *LUMINIDEPENDENS* is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates *LEAFY* expression. *Plant J.* 18, 195–203.
- Aukerman MJ. 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 JA., Ruiz-García L. y Martínez-Zapater JM.** (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 JM.** (2005). Environmental regulation of flowering. *Int J Dev Biol.* 49(5-6), 689-705.
- Ayre BG. y Turgeon R.** (2004). Graft transmission of a floral stimulant derived from *CONSTANS*. *Plant Physiol.* 135(4), 2271-2278.
- Balasubramanian S., Sureshkumar S., Agrawal M., Michael TP., Wessinger C., Maloof JN., 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.
- Balciunas D. y Ronne H.** (2000). Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends Biochem Sci.* 25(6), 274-276.

- Barlow PN., Luisi B., Milner A., Elliott M. y Everett R.** (1994). Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol.* 237, 201-211.
- Barrero JM., González-Bayón R., del Pozo JC., Ponce MR. y Micol JL.** (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.
- Bastola DR., Pethe VV. y Winicov I.** (1998). Alfin1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible MsPRP2 gene. *Plant Mol Biol.* 38(6), 1123-1135.
- 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.
- Baumbusch LO., Thorstensen T., Krauss V., Fischer A., Naumann K., Assalkhou R., Schulz I., Reuter G. y Aalen RB.** (2001). The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.* 29(21), 4319-4333.
- Bäurle I. y Dean C.** (2006). The timing of developmental transitions in plants. *Cell* 125, 655-664.
- Ben-Naim O., Eshed R., Parnis A., Teper-Bamnik P., Shalit A., Coupland G., Samach A. y Lifschitz E.** (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J.* 46(3), 462-476.
- Bernatzky R. y Tanksley SD.** (1986). Toward a Saturated Linkage Map in Tomato Based on Isozymes and Random Cdna Sequences. *Genetics* 112(4), 887-898.
- Bernier G.** (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 39, 175– 219.
- 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.
- Betz JL., Chang M., Washburn TM., Porter SE., Mueller CL. y Jaehning JA.** (2002). Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol Genet Genomics.* 268(2), 272-285.
- Bezhani S., Winter C., Hershman S., Wagner JD., Kennedy JF., Kwon CS., Pfluger J., Su Y. y Wagner D.** (2007). Unique, shared, and redundant roles for the *Arabidopsis* SWI/SNF chromatin remodeling ATPases BRAHMA and SPLAYED. *Plant Cell.* 19(2), 403-416.
- Bhaumik SR., Smith E. y Shilatifard A.** (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 14, 1008-1016.
- Bienz M.** (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain, *Trends Biochem. Sci.* 31, 35–40.
- Birve A., Sengupta A.K., Beuchle D., Larsson J., Kennison J.A., Rasmuson-Lestander A. y Müller J.** (2001). Su (z) 12, a novel *Drosophila* Polycomb group gene that is conserved in vertebrates and plants. *Development* 128,3371–3379.
- 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 MA, Ahn JH, Weigel D.** (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet.* 33(2), 168-171.

- Bonhomme F., Kurz B., Melzer S., Bernier G. y Jacqmard A.** (2000). Cytokinin and gibberellin activate SaMADS A, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *Plant J.* 24(1), 103-111.
- Borner R., Kampmann G., Chandler J., Gleissner R., Wisman E., Apel K. y Melzer S.** (2000). A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24, 591–599.
- Bouveret R., Schönrock N., Grisse W. y Hennig L.** (2006). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* MSI1. *Development.* 133(9), 1693-1702.
- 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.
- Bradley D., Ratcliffe O., Vincent C., Carpenter R. y Coen E.** (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* 275, 80–83.
- Cai Y., Jin J., Florens L., Swanson SK., Kusch T., Li B., Workman JL., Washburn MP., Conaway RC. y Conaway JW.** (2005). The mammalian YL1 protein is a shared subunit of the TRRAP/TIP60 histone acetyltransferase and SRCAP complexes. *J Biol Chem.* 280(14), 13665-13670.
- Callebaut I., Courvalin JC. y Mornon JP.** (1999). The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Lett.* 446(1), 189-93.
- 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.
- Carrozza MJ., Uteley RT., Workman JL. y Côté J.** (2003). The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* 19(6), 321-329.
- Castillejo C. y Pelaz S.** (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Curr Biol.* 18, 1338- 1343.
- Chailakhyan MK.** (1936). New facts in support of the hormonal theory of plant development. *C. R. Acad. Sci. URSS* 13, 79–83.
- Champagne KS., Saksouk N., Peña PV., Johnson K., Ullah M., Yang XJ., Côté J. y Kutateladze TG.** (2008). The crystal structure of the ING5 PHD finger in complex with an H3K4me3 histone peptide. *Proteins.* 72(4), 1371-1376.
- Champagne KS. y Kutateladze TG.** (2009). Structural insight into histone recognition by the ING PHD fingers. *Curr Drug Targets.* 10(5), 432-441.
- Chandler J., Wilson A. y Dean C.** (1996). *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J.* 10, 637-644.
- 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.
- Chanvivattana Y., Bishopp A., Schubert D., Stock C., Moon YH., Sung ZR. y Goodrich J.** (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development.* 131(21), 5263-5276.
- Chen ZJ. y Tian L.** (2007). Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 295-307.

- 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 JK. y Howe LJ.** (2009). Histone acetylation: truth of consequences?. *Biochem Cell Biol.* 87(1), 139-150.
- Chou ML., Haung MD. y Yang CH.** (2001). EMF genes interact with late-flowering genes in regulating floral initiation genes during shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42(5), 499-507.
- 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.
- Cloos PA., Christensen J., Agger K. y Helin K.** (2008). Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev.* 22(9), 1115-1140.
- Clough SJ. y Bent AF.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Connelly JJ., Yuan P., Hsu HC., Li Z., Xu RM. y Sternglanz R.** (2006). Structure and function of the *Saccharomyces cerevisiae* Sir3 BAH domain. *Mol Cell Biol.* 26(8), 3256-3265.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C. y Coupland G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030-33.
- Crevillén P. y Dean C.** (2010). Regulation of the floral repressor gene *FLC*: the complexity of transcription in a chromatin context. *Curr Opin Plant Biol.*
- Cseke LJ., Zheng J. y Podila GK.** (2003). Characterization of *PTM5* in aspen trees: a MADS-box gene expressed during woody vascular development. *Gene.* 318, 55-67.
- de Folter S., Immink RG., Kieffer M., Parenicová L., Henz SR., Weigel D., Busscher M., Kooiker M., Colombo L., Kater MM., Davies B. y Angenent GC.** (2005). Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS Box transcription factors. *Plant Cell* 17, 1424-1433.
- de la Serna IL., Ohkawa Y. y Imbalzano AN.** (2006). Chromatin remodelling in mammalian differentiation: lessons from ATP-dependent remodellers. *Nat Rev Genet.* 7(6), 461-473.
- de Lucia F., Crevillén P., Jones A.M., Greb T. y Dean C.** (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of *FLC* during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(44):16831-6.
- 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.

- Dennis ES. y Peacock WJ.** (2007). Epigenetic regulation of flowering. *Curr Opin Plant Biol.* 10(5), 520-527.
- Ditta G., Pinyopich A., Robles P., Pelaz S. y Yanofsky MF.** (2004). The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Curr Biol.* 14(21), 1935-1940.
- Dominguez M. y Berger F.** (2008). Chromatin and the cell cycle meet in Madrid. *Development.* 135(21), 3475-3480.
- Dover J, Schneider J, Tawiah-Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A.** (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem.* 277(32), 28368-28371.
- 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.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J.** (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell.* 21(1), 51-64.
- Eberharter A, Vetter I, Ferreira R, Becker PB.** (2004). ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts. *Embo J.* 23, 4029-4039.
- el-Assal SE., Alonso-Blanco C., Hanhart CJ. y Koornneef M.** (2001). Pleiotropic effects of the *Arabidopsis CRYPTOCHROME 2* allelic variation underlie fruit trait-related QTL. *Plant Biol (Stuttgart)* 6(4), 370-4.
- 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.
- 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., Hurtado L. y Reyes JC.** (2007). A nucleosome interaction module is required for normal function of *Arabidopsis thaliana* *BRAHMA*. *J Mol Biol.* 373(2), 240-250.
- 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.
- Feinberg AP. y Vogelstein B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1), 6-13.
- Ferrario S., Busscher J., Franken J., Gerats T., Vandebussche M., Angenent GC. y Immink RG.** (2004). Ectopic expression of the petunia MADS box gene *UNSHAVEN* accelerates flowering and confers leaf-like characteristics to floral organs in a dominant-negative manner. *Plant Cell.* 16(6), 1490-1505.
- Fiedler M, Sánchez-Barrena MJ, Nekrasov M, Mieszczanek J, Rybin V, Müller J, Evans P, Bienz M.** (2008). Decoding of methylated histone H3 tail by the Pygo-BCL9 Wnt signaling complex. *Mol Cell.* 30, 507-518.
- Fleck B. y Harberd N.P.** (2002). Evidence that the *Arabidopsis* nuclear gibberellin signalling protein *GAI* is not destabilised by gibberellin. *Plant J.* 32(6), 935-947.
- Fornara F., de Montaigu A. y Coupland G.** (2010). SnapShot: Control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell.* 141, 550e1-550e3.
- Forneris F., Binda C., Battaglioli E. y Mattevi A.** (2008). LSD1: oxidative chemistry for multifaceted functions in chromatin regulation. *Trends Biochem Sci.* 33(4), 181-189.

- Fowler S., Lee K., Onouchi H., Samach A., Richardson K., Morris B., Coupland G. y Putterill J.** (1999). GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J.* 18(17), 4679-4688.
- Fuchs J., Demidov D., Houben A. y Schubert I.** (2006). Chromosomal histone modification patterns from conservation to diversity. *Trends Plant Sci.* 11(4), 199-208.
- Fujiyama K., Tanaka R., Terashima M. y Seki T.** (2002). N-linked glycan structures of glycoproteins in suspensión cultured *Arabidopsis thaliana* MM2d cells. *Plant Biotech.* 24, 255-259.
- Gaudin V., Libault M., Pouteau S., Juul T., Zhao G., Lefebvre D. y Grandjean O.** (2001). Mutations in *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1* affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* 128, 4847-4858.
- 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., Bäurle I., Kidou S., Hu X. y Dean C.** (2009). FRIGIDA delays flowering in *Arabidopsis* via a cotranscriptional mechanism involving direct interaction with the nuclear cap-binding complex. *Plant Physiol.* 150(3), 1611-1618.
- Giakountis A. y Coupland G.** (2008). Phloem transport of flowering signals. *Curr Opin Plant Biol.* 11(6), 687-694.
- Giavalisco P., Kapitza K., Kolasa A., Buhtz A. y Kehr J.** (2006). Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics.* 6(3), 896-909.
- Gocal GF., King RW., Blundell CA., Schwartz OM., Andersen CH. y Weigel D.** (2001). Evolution of floral meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to *APETALA1* and *LEAFY* of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 125, 1788-1801.
- 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.
- Goodrich J., Puangsomlee P., Martin M., Long D., Meyerowitz E.M. y Coupland G.** (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386, 44-51.
- Goodwin GH. y Nicholas RH.** (2001). The BAH domain, polybromo and the RSC chromatin remodelling complex. *Gene.* 268(1-2), 1-7.
- Gozani O., Karuman P., Jones DR., Ivanov D., Cha J., Lugovskoy AA., Baird CL., Zhu H., Field SJ., Lessnick SL., Villasenor J., Mehrotra B., Chen J., Rao VR., Brugge JS., Ferguson CG., Gregis V., Sessa A., Colombo L., y Kater M.M.** (2008). *AGAMOUS-LIKE24* and *SHORT VEGETATIVE PHASE* determine floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56(6), 891-902.
- Greb T., Mylne JS., Crevillen P., Geraldo N., An H., Gendall AR. y Dean C.** (2007). The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis FLC*. *Curr Biol.* 17(1), 73-78.
- Grewal SI. y Moazed D.** (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science.* 301(5634), 798-802.
- Grozinger CM. y Schreiber SL.** (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol.* 9, 3-16.
- Gu X., Jiang D., Wang Y., Bachmair A. y He Y.** (2009). Repression of the floral transition via histone H2B monoubiquitination. *Plant J.* 57(3), 522-533.
- Hanzawa Y., Money T. y Bradley D.** (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(21), 7748-7753.

- Hayama R. y Coupland G.** (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr Opin Plant Biol* 6, 13–19.
- Hayama R. y Coupland G.** (2004). The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 135(2), 677-684.
- 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.
- Helliwell CA., Wood CC., Robertson M., James Peacock W. y Dennis ES.** (2006). The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J.* 46, 183–192.
- Hennig L., Bouveret R. y Grussem W.** (2005). MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol.* 15(6), 295-302.
- Hennig L. y Derkacheva M.** (2009). Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? *Trends Genet.* (9), 414-423.
- Hepworth SR., Valverde F., Ravenscroft D., Mouradov A. y Coupland G.** (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO J.* 21(16), 4327-4337.
- 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.
- Holm M., Hardtke CS., Gaudet R. y Deng XW.** (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *EMBO J.* 20(1-2), 118-127.
- Honma T. y Goto K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature.* 409(6819), 525-529.
- Hughes CM., Rozenblatt-Rosen O., Milne TA., Copeland TD., Levine SS., Lee JC., Hayes DN., Shanmugam KS., Bhattacharjee A., Biondi CA., Kay GF., Hayward NK., Hess JL. y Meyerson M.** (2004). Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *Hoxc8* locus. *Mol Cell.* 13, 587–597.
- Hughes RM., Wiggins KR. Khorasanizadeh S. y Waters ML.** (2007). Recognition of trimethyllysine by a chromodomain is not driven by the hydrophobic effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 11184-11188.
- Hurtado L., Farrona S. y Reyes JC.** (2006). The putative SWI/SNF complex subunit BRAHMA activates flower homeotic genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 62(1-2), 291-304.
- Imaizumi T., Tran HG., Swartz TE., Briggs WR. y Kay SA.** (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature.* 426(6964), 302-306.
- 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.
- Imaizu T.** (2009). *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about the localization. *Curr Opin Plant Biol.* 13, 83-89.

- Ishibashi, T., Dryhurst, D., Rose KL., Shabanowitz J., Hunt, DF., y Ausio J.** (2009). Acetylation of vertebrate H2A.Z and its effect on the structure of the nucleosome. *Biochemistry* 48, 5007–5017.
- Iwase S., Lan F., Bayliss P., de la Torre-Ubieta L., Huarte M., Qi HH., Whetstine JR., Bonni A., Roberts TM. y Shi Y.** (2007). The X-linked mental retardation gene *SMCX/JARID1C* defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*. 128(6), 1077-1088.
- Jackson SD.** (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytol.* 181(3), 517-531.
- Jaeger KE. y Wigge PA.** (2007). FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Curr Biol.* 17(12), 1050-1054.
- 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.
- Jarillo JA, del Olmo I., Gómez-Zambrano A., Lázaro A., López-González L., Miguel E., Narro-Diego L., Sáez D. y Piñeiro M.** (2008). Review. Photoperiodic control of flowering time. *Span J Agri.* 6 (Special issue), 221-244.
- Jarillo JA., Piñeiro M., Cubas P., Martínez-Zapater JM.** (2009). Chromatin remodeling in plant development. *Int J Dev Biol.*
- Jenuwein T.** (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trend Cell Biol.* 11(6), 266-273.
- 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.
- Jerzmanowski A.** (2007). SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochim Biophys Acta.* 1769(5-6), 330-345.
- 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.
- 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(5490), 344-347.
- Jung JH., Seo YH., Seo PJ., Reyes JL., Yun J., Chua NH. y Park CM.** (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19(9), 2736-2748.
- Kaadige MR. y Ayer DE.** (2006). The polybasic region that follows the plant homeodomain zinc finger 1 of Pf1 is necessary and sufficient for specific phosphoinositide binding. *J Biol Chem.* 281(39), 28831-28836.
- Kandasamy M.K., Deal R.B., McKinney E.C. y Meagher R.B.** (2005). 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.

- Kapoor A., Agarwal M., Andreucci A., Zheng X., Gong Z., Hasegawa PM., Bressan RA. y Zhu JK.** (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 JK.** (2005b). Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett.* 579(26), 5889-5898.
- Karagianni P., Amazit L., Qin J. y Wong J.** (2008). ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Mol Cell Biol.* 705-717.
- Kardailsky I., Shukla V.K., Ahn J.H., Dagenais N., Christensen S.K., Nguyen J.T., Chory J. Harrison M.J. y Weigel D.** (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*, 286, 1962-1965.
- Kim DH., Doyle MR., Sung S. y Amasino RM.** (2009). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25, 277-299.
- 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.** (2005b). Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis* requires a putative histone H3 methyltransferase. *Plant Cell* 17, 3301-3310.
- Kim SY., Kim SG., Kim YS., Seo PJ., Bae M., Yoon HK. y Park CM.** (2007b). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res.* 35(1), 203-213.
- 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.
- King RW., Moritz T., Evans LT., Martin J., Andersen CH., Blundell C., Kardailsky I. y Chandler PM.** (2006). Regulation of flowering in the long-day grass *Lolium temulentum* by gibberellins and the *FLOWERING LOCUS T* gene. *Plant Physiol.* 141(2), 498-507.
- Kinoshita T., Harada JJ., Goldberg RB. y Fischer RL.** (2001). Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14156-14161.
- 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.
- Kobayashi Y., Kaya H., Goto K., Iwabuchi M. y Araki T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286, 1960-1962.
- Kobayashi Y. y Weigel D.** (2007). Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* 21(19), 2371-2384.
- 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.
- Köhler C. y Grossniklaus U.** (2002). Epigenetic inheritance of expression states in plant development: the role of Polycomb group proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 14(6), 773-779.
- Köhler C., Hennig L., Bouveret R., Gheyselinck J., Grossniklaus U. y Grissem W.** (2003). *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *EMBO J.* 22, 4804 - 4814

- Köhler C. y Villar CB.** (2008). Programming of gene expression by Polycomb group proteins. *Trends Cell Biol.* 18(5), 236-243.
- Koornneef M. y Van der Veen JH.** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Ther Appl Genet* 58. 257-263.
- Koornneef M., Elgersma A., Hanhart CJ., Loenen Martinet EP.** (1985). New linkage data of chromosome 1 with a case of very close linkage of three genes affecting plant height. *Arabid Inf Serv.* 22, 43-48.
- 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.
- Koornneef M., Blankestijn-de Vries H., Hanhart C., Soppe W. y Peeters T.** (1994). The phenotype of some late-flowering mutants is enhanced by a locus on chromosome 5 that is not effective in the *Landsberg erecta* wild-type. *Plant J.* 6, 911-919.
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Blankestijn-de Vries, H., Hanhart CJ. y Peeters AJM.** (1998a). Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics.* 148, 885-892.
- Koornneef M., Alonso-Blanco C., Peeters AJM. y Soppe W.** (1998b). Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 345-370.
- Kotake T., Takada S., Nakahigashi K., Ohto M. y 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.
- Kouzarides T.** (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev.* 12(2), 198-209.
- Kouzarides T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell.* 128, 693-705.
- Krichevsky A., Gutgarts H., Kozlovsky S.V., Tzfira T., Sutton A., Sternglanz R., Mandel G. y Citovsky V.** (2007). C2H2 zinc finger-SET histone methyltransferase is a plant-specific chromatin modifier. *Dev Biol.* 303(1), 259-269.
- Krogan NJ., Dover J., Wood A., Schneider J., Heidt J., Boateng MA., Dean K., Ryan OW., Golshani A. y Johnston M.** (2003). 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.** (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell.* (6), 1565-1576.
- Kumar SV. y Wigge PA.** (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell.* 140(1), 136-147.
- Kutateladze T. y Overduin M.** (2001). Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science.* 291, 1793-1796.
- Kuzmichev A., Zhang Y., Erdjument-Bromage H., Tempst P. y Reinberg D.** (2002) Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33 (ING1). *Mol Cell Biol.* 22, 835-848.
- Kwon CS. y Wagner D.** (2007). Unwinding chromatin for development and growth: a few genes at a time. *Trends Genet.* 23(8), 403-412.
- Kwon CS., Lee D., Choi G. y Chung WI.** Histone occupancy-dependent and -independent removal of H3K27 trimethylation at cold-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 60(1), 112-121.

- Lan F., Collins RE., De Cegli R., Alpatov R., Horton JR., Shi X., Gozani O., Cheng X. y Shi Y.** (2007). Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature*. 448(7154), 718-722.
- Lan F., Nottke AC. y Shi Y.** (2008). Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol*. 20(3), 316-325.
- Langridge J.** (1957) Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis*. *Nature*. 180, 36–37.
- Larsson AS., Landberg K. y Meeks-Wagner DR.** (1998) The *TERMINAL FLOWER2 (TFL2)* gene controls the reproductive transition and meristem identity in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149, 597–605.
- Latrasse D., Benhamed M., Henry Y., Domenichini S., Kim W., Zhou DX. y Delarue M.** (2008). The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*. 8, 121.
- Laubinger S., Marchal V., Le Gourrierec J., Wenkel S., Adrian J., Jang S., Kulajta C., Braun H., Coupland G. y Hoecker U.** (2006). *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Development* 133, 3213–3222.
- 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.
- Lecompte O., Poch O. y Laporte J.** (2008). PtdIns5P regulation through evolution: roles in membrane trafficking? *Trends Biochem Sci*. 33(10), 453-460.
- Lee H., Suh S.S., Park E., Cho E., Ahn J.H., Kim S.G., Lee J.S., Kwon Y.M. y Lee I.** (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 14, 2366–276.
- 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 I., Bleecker A. y Amasino R.** (1993). Analysis of naturally occurring late flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Mol gen Genet*. 237, 171-176.
- 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(1), 75-83.
- Lee JH., Yoo SJ., Park SH., Hwang I., Lee JS. y Ahn JH.** (2007a). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. 21(4), 397-402.
- Lee JH., Nam J., Park H.C., Na G., Miura K., Jin J.B., Yoo C.Y., Baek D., Kim D.H. y Jeoung J.C.** (2007b). Salicylic acid-mediated innate immunity in *Arabidopsis* is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant J*. 49, 79-90.
- 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, MG., Wynder, C., Bochar, DA., Hakimi, MA., Cooch, N., y Shiekhattar, R.** (2006). Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Mol Cell Biol*. 26, 6395–6402.
- Lee MG, Norman J, Shilatifard A, Shiekhattar R.** (2007). Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a polycomb-like protein. *Cell*. 128, 877-887.

- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A.** (2007). Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*. 131(6), 1084-1096.
- Lee WY., Lee D., Chung WI. y Kwon CS.** (2009). Arabidopsis ING and Alfin1-like protein families localize to the nucleus and bind to H3K4me3/2 via plant homeodomain fingers. *Plant J*. 58(3), 511-524.
- Lee J. y Lee I.** (2010). Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *J Exp Bot*. 61(9), 2247-2254.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G. and Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* 105, 805-814.
- Levy YY., Mesnage S., Mylne JS., Gendall AR. y Dean C.** (2002). Multiple roles of Arabidopsis *VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science* 97(5579), 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.** (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Dev Cell* 15(1), 110-120.
- Li F., Huarte M., Zaratiegui M., Vaughn MW., Shi Y., Martienssen R. y Cande WZ.** (2008). Lid2 is required for coordinating H3K4 and H3K9 methylation of heterochromatin and euchromatin. *Cell*. 135(2), 272-283.
- Li H., Ilin S., Wang W., Duncan EM., Wysocka J., Allis CD. y Patel DJ.** (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*. 442, 91-95.
- Li H., Fischle W., Wang W., Duncan EM., Liang L., Murakami-Ishibe S., Allis CD. y Patel DJ.** (2007). Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD finger. *Mol Cell*. 28, 677-691.
- 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.
- Lin MK., Belanger H., Lee YJ., Varkonyi-Gasic E., Taoka K., Miura E., Xoconostle-Cázares B., Gendler K., Jorgensen RA., Phinney B., Lough TJ., Lucas WJ.** (2007). *FLOWERING LOCUS T* protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell*. 19(5), 1488-1506.
- Liu C., Chen H., Er H.L., Soo H.M., Kumar P.P., Han J.H., Liou Y.C. y Yu H.** (2008b). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development*. 2008, 135(8), 1481-1491.
- Liu F., Quesada V., Crevillén P., Bäurle I., Swiezewski S. y Dean C.** (2007a). The Arabidopsis RNA-binding protein FCA requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate *FLC*. *Mol Cell*. 28(3), 398-407.
- Liu LJ., Zhang YC., Li QH., Sang Y., Mao J., Lian HL., Wang L. y Yang HQ.** (2008). COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in Arabidopsis. *Plant Cell*. 20(2), 292-306.
- Loidl, P.** (2004). A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci*. 9, 84–90.
- Loyola A. y Almouzni G.** (2004). Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta*. 1677(1-3), 3-11.
- 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.

- Luo J., Nikolaev AY. y Imai S.** (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 107, 137–48.
- Luo M., Bilodeau P., Dennis ES., Peacock WJ. y Chaudhury A.** (2000). Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing Arabidopsis seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(19), 10637-10642.
- 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.
- Macknight R., Duroux M., Laurie R., Dijkwel P., Simpson G. y Dean C.** (2002). Functional significance of the alternative transcript processing of the Arabidopsis floral promoter *FCA*. *Plant Cell*. 14, 877-888.
- Makarevich G., Leroy O., Akinci U., Schubert D., Clarenz O., Goodrich J., Grossniklaus U. y Köhler C.** (2006). Different Polycomb group complexes regulate common target genes in Arabidopsis. *EMBO Rep*. 7(9), 947-952.
- March-Díaz R., García-Domínguez M., Florencio FJ. y Reyes JC.** (2007). SEF, a new protein required for flowering repression in Arabidopsis, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiol*. 143(2), 893-901.
- Martin DG., Baetz K., Shi X., Walter KL., MacDonald VE., Wlodarski MJ., Gozani O., Hieter P. y Howe L.** (2006). The Yng1p plant homeodomain finger is a methyl-histone binding module that recognizes lysine 4-methylated histone H3. *Mol Cell Biol*. 26, 7871-7879.
- Martinez-Balbas, MA., Tsukiyama, T., Gdula, D. y Wu, C.** (1998). Drosophila NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 132-137.
- Martínez C., Pons E., Prats G. y León J.** (2004). Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development. *Plant J*. 37(2), 209-217.
- 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.
- Más P.** (2008). Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends Cell Biol*. 18(6), 273-281.
- Mathieu J., Warthmann N., Kuttner F. y Schmid M.** (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. *Curr Biol*. 17, 1055–1060.
- Mathieu J., Yant LJ., Mürdter F., Küttner F. y Schmid M.** (2009). Repression of flowering by the miR172 target *SMZ*. *PLoS Biol*. 7(7), e1000148.
- Matthews AG, Kuo AJ, Ramon-Maiques S, Han S, Champagne KS, Ivanov D, Gallardo M, Carney D, Cheung P, Ciccone DN.** (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature*. 450, 1106–1110.
- Metzger E., Wissmann M., Yin N., Müller JM., Schneider R., Peters AH., Günther T., Buettner R. y Schüle R.** (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*. 437(7057), 436-439.
- Michaels SD. y Amasino RM.** (1999a). *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*. 11, 949–956.
- Michaels SD. y Amasino RM.** (2001). Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *fri* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell*. 13, 935-941.

- Michaels SD., Ditta G., Gustafson-Brown C., Peláz S., Yanofsky M. y Amasino RM.** (2003b). *AGL24* acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization. *Plant J.* 33(5), 867-874.
- Michaels SD., Himelblau E., Kim SY., Schomburg FM. y Amasino RM.** (2005). Integration of flowering signals in winter-annual Arabidopsis. *Plant Physiol.* 137, 149–156.
- Miller T., Krogan NJ., Dover J., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Johnston M., Greenblatt JF. y Shilatifard A.** (2001). COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(23), 12902-12907.
- Mimida N., Goto K., Kobayashi Y., Araki T., Ahn JH., Weigel D., Murata M., Motoyoshi F. y Sakamoto W.** (2001). Functional divergence of the TFL1-like gene family in Arabidopsis revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells.* 6(4), 327-336.
- Misra S. y Hurley JH.** (1999). Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell.* 97, 657-666.
- Mitchell PJ. y Tjlan R.** (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* 245, 371-378.
- Mizuguchi, G., Tsukiyama, T., Wisniewski, J. y Wu, C.** (1997). Role of nucleosome remodeling factor NURF in transcriptional activation of chromatin. *Mol Cell.* 1, 141-150.
- Mizukami Y. y Ma H.** (1997). Determination of Arabidopsis floral meristem identity by *AGAMOUS*. *Plant Cell.* 9(3), 393-408.
- Mockler TC., Yu X., Shalitin D., Parikh D., Michael TP., Liou J., Huang J., Smith Z., Alonso JM., Ecker JR., Chory J y Lin C.** (2004). Regulation of flowering time in Arabidopsis by K homology domain proteins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(34), 12759-12764.
- Moon J., Suh S.S., Lee H., Choi K.R., Hong C.B., Paek N.C., Kim S.G. y Lee I.** (2003). The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *Plant J.* 35(5), 613-623.
- Moon J., Lee H., Kim M. y Lee I.** (2005). Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 46 (2), 292-299.
- Müller P., Park S., Shor E., Huebert DJ., Warren CL., Ansari AZ., Weinreich M., Eaton ML., MacAlpine DM. y Fox CA.** (2010). The conserved bromo-adjacent homology domain of yeast Orc1 functions in the selection of DNA replication origins within chromatin. *Gen Dev.* 24(13), 1418-1433.
- Murfett J., Wang X., Hagen G. y Guilfoyle TJ.** (2001). Identification of Arabidopsis histone deacetylase HDA6 mutants that affect transgene expression. *Plant Cell* 13, 1047–1061.
- Murtas G., Reeves PH., Fu Y-F., Bancroft I., Dean C. y Coupland G.** (2003). A nuclear protease required for flowering-time regulation in Arabidopsis reduces the abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER conjugates. *Plant Cell.* 15, 2308-2319.
- Müssig C., Kauschmann A., Clouse SD. y Altmann T.** (2000). The Arabidopsis PHD-finger protein SHL is required for proper development and fertility. *Mol Gen Genet.* 264(4), 363-370.
- Müssig C. y Altmann T.** (2003). Changes in gene expression in response to altered SHL transcript levels. *Plant Mol Biol.* 53(6), 805-820.
- Mutasa-Göttgens E. y Hedden P.** (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot.* 60(7), 1979-1989.
- Mylne JS., Barrett L., Tessadori F., Mesnage S., Johnson L., Bernatavichute YV., Jacobsen SE., 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.

- Nagy PL., Griesenbeck J., Kornberg RD. y Cleary ML.** (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(1), 90-94.
- Nakamura T., Song J., Fukuda T., Yokoyama J., Maki M., Ochiai T., Kameya T. y Kanno A.** (2005). Characterization of TrcMADS1 gene of *Trillium camtschaticense* (Trilliaceae) reveals functional evolution of the SOC1/TM3-like gene family. *J Plant Res.* 118(3), 229-234.
- Ng HH., Robert F., Young RA. y Struhl K.** (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell.* 11, 709-719.
- Nicolas RH. y Goodwin GH.** (1996). Molecular cloning of polybromo, a nuclear protein containing multiple domains including five bromodomains, a truncated HMG-box, and two repeats of a novel domain. *Gene.* 175(1-2), 233-240.
- Noguchi K., Vassilev A., Ghosh S., Yates JL. y DePamphilis ML.** (2007). The BAH domain facilitates the ability of human Orc1 protein to activate replication origins in vivo. *EMBO J.* 25(22), 5372-5382.
- 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, 2601-2613.
- 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.
- 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.
- Notaguchi M., Abe M., Kimura T., Daimon Y., Kobayashi T., Yamaguchi A., Tomita Y., Dohi K., Mori M. y Araki T.** (2008). Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* 49(11), 1645-1658.
- 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.
- Oh S., Park S., y van Nocker S.** (2008). Genic and global functions for Paf1C in chromatin modification and gene expression in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 4(8), e1000077.
- Ohada N., Yadegarib R., Margossianb L., Hannonb M., Michaelib D., Haradac JJ., Goldbergd RB., y Fischerb RL.** (1999). Mutations in FIE, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell.* 11, 407-416.
- Oliver AW., Jones SA., Roe SM., Matthews S., Goodwin GH. y Pearl LH.** (2005). Crystal structure of the proximal BAH domain of the polybromo protein. *Biochem J* 389, 657-664.
- Onishi M., Liou GG., Buchberger JR., Walz T. y Moazed D.** (2007). Role of the conserved Sir3-BAH domain in nucleosome binding and silent chromatin assembly. *Mol Cell.* 28(6), 1015-1028.
- Onouchi H., Igeno MI., Perilleux C., Graves K. y Coupland G.** (2000). Mutagenesis of plants overexpressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell* 12, 885-900.
- Osterlund MT., Hardtke CS., Wei N. y Deng XW.** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature.* 405(6785), 462-466.

- Palacios A., Garcia P., Padró D., López-Hernández E., Martín I. y Blanco FJ.** (2006). Solution structure and NMR characterization of the binding to methylated histone tails of the plant homeodomain finger of the tumour suppressor ING4. *FEBS letts.* 580(30), 6903-6908.
- Palacios A., Muñoz IG., Pantoja-Uceda D., Marcaida MJ., Torres D., Martín-García JM., Luque I., Montoya G. y Blanco FJ.** (2008). Molecular basis of histone H3K4me3 recognition by ING4. *J Biol Chem.* 283(23), 15956-15964.
- Pandey R., Muller A., Napoli CA., Selinger DA., Pikaard CS., Richards EJ., Bender J., Mount DW. y Jorgensen RA.** (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30, 5036–5055.
- 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.
- Payraastre B., Myszka DG., Cantley LC., Wagner G., Divecha N., Prestwich GD. y Yuan J.** (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell.* 114(1), 99-111.
- Pei Y., Niu L., Lu F., Liu C., Zhai J., Kong X. y Cao X.** (2007). Mutations in the Type II protein arginine methyltransferase *AtPRMT5* result in pleiotropic developmental defects in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 144(4), 1913-1923.
- PeLáz S., Ditta GS., Baumann E., Wisman E. y Yanofsky MF.** (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature.* 405(6783), 200-203.
- Peña PV., Davrazou F., Shi X., Walter KL., Verkhusha VV., Gozani O., Zhao R. y Kutateladze TG.** (2006). Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature.* 442, 100-103.
- Perales M. y Más P.** (2007). A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the *Arabidopsis* biological clock. *Plant Cell.* 19(7), 2111-2123.
- Pien S. y Grossniklaus U.** (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta.* 1769(5-6), 375-382.
- Pien S., Fleury D., Mylne J.S., Crevillen P., Inzé D., Avramova Z., Dean C. y 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.
- 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., Carre I., Gaudin V., Ferret V., Lefebvre D. y Wilson M.** (2008). Diversification of photoperiodic response patterns in a collection of early flowering mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148(3), 1465-1473.
- Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR 3rd, Grant PA.** (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature.* 433(7024), 434-438.
- 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.
- Qian C. y Zhou MM.** (2006). SET domain protein lysine methyltransferases: structure, specificity and catalysis. *Cell Mol. Life Sci.* 632755-632763.
- Quesada V., Macknight R., Dean C. y Simpson G.G.** (2003). Autoregulation of *FCA* pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time. *EMBO J.* 22, 3142-3152.
- Ragvin A, Valvatne H, Erdal S, Arskog V, Tufteland KR, Breen K, ØYan AM, Eberharter A, Gibson TJ, Becker PB, Aasland R.** (2004). Nucleosome binding by the bromodomain and PHD finger of the transcriptional cofactor p300. *J Mol Biol.* 337, 773-788.
- Rameh LE., Tolias KF., Duckworth BC., Cantley LC.** (1997). A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. *Nature.* 390 (6656), 192–196.
- 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 OJ., Nadzan GC., Reuber TL. y Riechmann JL.** (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.
- Reddy TV., Kaur J., Agashe B., Sundaresan V. y Siddiqi I.** (2003) The DUET gene is necessary for chromosome organization and progression during male meiosis in Arabidopsis and encodes a PHD finger protein. *Development,* 130, 5975–5987.
- Reeves PH. y 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.
- Richards EJ. y Elgin SC.,** (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell.* 108(4), 489-500.
- Ringrose L. y Paro R.** (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development.* 134(2), 223-232.
- Robyr D., Suka Y. y Xenarios I.** (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell.* 109, 437–446.
- Roden LC., Song HR., Jackson S., Morris K. y Carre IA.** (2002). Floral responses to photoperiod are correlated with the timing of rhythmic expression relative to dawn and dusk in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20), 13313-13318.
- Ruiz-García L., Madueño F., Wilkinson M., Haughn G., Salinas J. y Martínez-Zapater JM.** (1997). Different roles of flowering-time genes in the activation of floral initiation genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 9, 1921–1934.
- Saddic LA., Huvermann B., Bezhani S., Su Y., Winter CM., Kwon CS., Collum RP. y Wagner D.** (2006). The *LEAFY* target *LMI1* is a meristem identity regulator and acts together with *LEAFY* to regulate expression of *CAULIFLOWER*. *Development.* 133(9), 1673-1682.

- Saha A., Wittmeyer J. y Cairns BR.** (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(6), 437-447.
- Saiga S., Furumizu C., Yokoyama R., Kurata T., Sato S., Kato T., Tabata S., Suzuki, M. y Komeda, Y.** (2008) The Arabidopsis OBERON1 and OBERON2 genes encode plant homeodomain finger proteins and are required for apical meristem maintenance. *Development*, 135, 1751–1759.
- Saijo Y., Sullivan JA., Wang H., Yang J., Shen Y., Rubio V., Ma L., Hoecker U. y Deng XW.** (2003). The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev.* 17(21), 2642-2647.
- Samach A., Onouchi H., Gold SE., Ditta GS., Schwarz-Sommer Z., Yanofsky MF. y Coupland G.** (2000). Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science.* 288, 1613-1616.
- Sambrook J., Fritsch EF. y Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampath V., Yuan P., Wang IX., Prugar E., van Leeuwen F. y Sternglanz R.** (2009). Mutational analysis of the Sir3 BAH domain reveals multiple points of interaction with nucleosomes. *Mol Cell Biol.* 29(10), 2532-2545.
- Sanchez M. y Gutierrez C.** (2009). Novel insights into the plant histone code: lessons from ORC1. *Epigenetics.* 4(4), 205-208.
- Sanda SL. y Amasino RM.** (1996). Ecotype-specific expression of a flowering mutant phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 111(2), 641-644.
- Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister AJ., Sherriff J., Bernstein BE., Emre NC., Schreiber SL., Mellor J. y Kouzarides T.** (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature.* 419 (6905), 407-411.
- Sarnowski TJ., Swiezewski S., Pawlikowska K., Kaczanowski S. y Jerzmanowski A.** (2002). AtSWI3B, an Arabidopsis homolog of SWI3, a core subunit of yeast Swi/Snf chromatin remodeling complex, interacts with FCA, a regulator of flowering time. *Nucleic Acids Res.* 30(15), 3412-3421.
- Sarnowski TJ., Ríos G., Jásik J., Swiezewski S., Kaczanowski S., Li Y., Kwiatkowska A., Pawlikowska K., Koźbiał M., Koźbiał P., Koncz C. y Jerzmanowski A.** (2005). SWI3 subunits of putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes play distinct roles during Arabidopsis development. *Plant Cell.* 17(9), 2454-2472.
- 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.
- Schmid M., Uhlenhaut NH., Godard F., Demar M., Bressan R., Weigel D. y Lohmann JU.** (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* 130, 6001-6012.
- Schindler U., Beckmann H. y Cashmore AR.** (1993). HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *Plant J.* 4, 137-150.
- Schmitz RJ. y Amasino RM.** (2007). Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic generegulation in plants. *Biochem Biophys Acta.* 1769(5-6), 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 U.S.A.* 105(2), 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.

- Schneider J., Wood A., Lee JS., Schuster R., Dueker J., Maguire C., Swanson SK., Florens L., Washburn MP. y Shilatifard A.** (2005). Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Mol Cell*. 19 (6) 849-856.
- 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.
- Schönrock N., Exner V., Probst A., Gruissem W. y Hennig L.** (2006). Functional Genomic Analysis of CAF-1 Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 281(14), 9560–9568.
- Schubert D., Primavesi L., Bishopp A., Roberts G., Doonan J., Jenuwein T. y Goodrich J.** (2006). Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J*. 25(19), 4638-4649.
- Schwab R., Palatnik JF., Riester M., Schommer C., Schmid M. y Weigel D.** (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell*. 8(4), 517-527.
- Schwartz YB. y Pirrotta V.** (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet*. 8(1), 9-22.
- Schwarz S., Grande AV., Bujdoso N., Saedler H. y Huijser P.** (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*. 67(1-2), 183-195.
- Schwechheimer C.** (2008). Understanding gibberellic acid signaling--are we there yet? *Curr Opin Plant Biol*. 11(1), 9-15.
- Searle I. y Coupland G.** (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *The EMBO J*. 23, 1217–1222.
- Searle I., He Y., Turck F., Vincent C., Fornara F., Kröber S., Amasino R. y Coupland G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signalling in Arabidopsis. *Gen Dev*. 20, 898-912.
- Seo HS., Yang JY., Ishikawa M., Bolle C., Ballesteros ML., Chua NH.** (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by *SPA1*. *Nature* 423, 995–999.
- Sheldon CC., Burn JE., Perez PP., Metzger J., Edwards JA., Peacock WJ. y Dennis ES.** (1999). The *FLC* MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*. 11(3), 445-458.
- Sheldon CC., Finnegan EJ., Dennis ES. y Peacock WJ.** (2006). Quantitative effects of vernalization on *FLC* and *SOC1* expression. *Plant J*. 45(6), 871-883.
- Sheldon CC., Hills MJ., Lister C., Dean C., Dennis ES. y Peacock WJ.** (2008). Resetting of *FLOWERING LOCUS C* expression after epigenetic repression by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(6), 2214-2219.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A. y Shi Y.** (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 119, 941-953.
- Shi YJ., Matson C., Lan F., Iwase S., Baba T. y Shi Y.** (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell*. 19(6), 857-864.
- Shi X., Hong T., Walter KL., Ewalt M., Michishita E., Hung T., Carney D., Peña P., Lan F., Kaadige MR., Lacoste N., Cayrou C., Davrazou F., Saha A., Cairns BR., Ayer DE., Kutateladze TG., Shi Y., Côté J., Chua KF. y Gozani O.** (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. 442, 96-99.

- Shi X., Kachirskaia I., Walter KL., Kuo JH., Lake A., Davrazou F., Chan SM., Martin DG., Fingerman IM., Briggs SD., Howe L., Utz PJ., Kutateladze TG., Lugovskoy AA., Bedford MT. y Gozani O.** (2007). Proteome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* identifies several PHD fingers as novel direct and selective binding modules of histone H3 methylated at either lysine 4 or lysine 36. *J Biol Chem.* 282(4), 2450-2455.
- Shilatifard A.** (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem.* 75, 243-269.
- Shindo C., Aranzana MJ., 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(2), 1163-1173.
- Shukla A., Stanojevic N., Duan Z., Shadle T. y Bhaumik SR.** (2006). Functional analysis of H2B-Lys-123 ubiquitination in regulation of H3-Lys-4 methylation and recruitment of RNA polymerase II at the coding sequences of several active genes in vivo. *J Biol Chem.* 281, 19045–19054.
- Silverstone AL., Tseng TS., Swain SM., Dill A., Jeong SY., Olszewski NE. y Sun TP.** (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 143(2), 987-1000.
- Simpson GG., Gendall AR. y Dean C.** (1999). When to switch to flowering. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 99, 519–550.
- Simpson GG. y Dean C.** (2002). Arabidopsis, the rosetta stone of flowering time? *Science.* 296, 285-289.
- 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.
- Simpson GG.** (2004). The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Curr Opin Plant Biol.* 7(5), 570-574.
- Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D.** (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 19, 629-639.
- Sims RJ 3rd, Chen CF, Santos-Rosa H, Kouzarides T, Patel SS, Reinberg D.** (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem.* 280(51), 41789-41792.
- Skowrya D., Zerenski M., Neznanov N., Li M., Choi Y., Uesugi M., Hauser CA., Gu W., Gudkov AV. y Qin J.** (2001) Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem.* 276, 8734-8739.
- Smith y Peterson.** (2005). ATP-dependent chromatin remodelling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 65: 115-148.
- Soliman MA. y Riabowol K.** (2007). After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends Biochem Sci.* 32(11), 509-519.
- Song HR., Song JD., Cho JN., Amasino RM., Noh B. y Noh YS.** (2009). The RNA binding protein ELF9 directly reduces SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 transcript levels in Arabidopsis, possibly via nonsense-mediated mRNA decay. *Plant Cell.* 21(4), 1195-1211.
- Song YH., Song NY., Shin SY., Kim HJ., Yun DJ., Lim CO., Lee SY., Kang KY. y Hong JC.** (2008). Isolation of CONSTANS as a TGA4/OBF4 interacting protein. *Mol Cells.* 25(4), 559-565.
- Soppe WJ., Bentsink L. y Koornneef M.** (1999). The early-flowering mutant *efs* is involved in the autonomous promotion pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 126, 4763-4770.
- Speulman E. y Salamini F.** (1995). GA3-regulated cDNAs from *Hordeum vulgare* leaves. *Plant Mol Biol.* 28(5), 915-926.

- Sterner, DE. y Berger, SL.** (2000). Acetylation of histone and transcription-related factors. *Microbiol. Mol Biol Rev.* 64, 435–459.
- 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* 409 (6832), 1116-1120.
- Sun ZW. y Allis CD.** (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature.* 418(6893), 104-108.
- Sung S. y Amasino RM.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature.* 427(6970), 159-164.
- Sung S. y Amasino RM.** (2005). Remembering winter: toward a molecular understanding of vernalization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 491–508.
- Sung S., He Y., Eshoo TW., Tamada Y., Johnson L., Nakahigashi K., Goto K., Jacobsen SE. y Amasino RM.** (2006a). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires *LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1*. *Nat Genet.* 38, 706–710.
- Sung S., Schmitz RJ. y Amasino RM.** (2006b). A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20(23), 3244-3248.
- Sung S. y Amasino RM.** (2006). Molecular genetic studies of the memory of winter. *J Exp Bot.* 57(13), 3369-3377.
- Sung ZR., Chen LJ., Moon YH. y Lertpiriyapong K.** (2003). Mechanisms of floral repression in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 6, 29-35.
- Swiezewski S., Liu F., Magusin A. y Dean C.** (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature.* 462(7274), 799-802.
- Takada S. y 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(12), 2856-2865.
- Takeuchi T., Watanabe Y., Takano-Shimizu T. y Kondo S.** (2006). Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn.* 235(9), 2449-2459.
- Talon M., Koornneef M. y Zeevaart JA.** (1990). Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(20), 7983-7987.
- Tamada Y., Yun JY., Woo SC. y 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.
- Taverna SD., Ilin S., Rogers RS., Tanny JC., Lavender H., Li H., Baker L., Boyle J., Blair LP., Chait BT., Patel DJ., Aitchison JD., Tackett AJ. y Allis CD.** (2006). Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell.* 24(5), 785-796.
- Telfer A., Bollman K. y Poethig SR.** (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 645-654.
- Tenney K. y Shilatifard A.** (2005). A COMPASS in the voyage of defining the role of trithorax/MLL-containing complexes: linking leukemogenesis to covalent modifications of chromatin. *J Cell Biochem.* 95(3), 429-436.

- Teper-Bamnolker P. y Samach A.** (2005). The flowering integrator *FT* regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 17, 2661–2675.
- Thambirajah AA., Dryhurst D., Ishibashi T., Li A., Maffey, AH., y Ausio J.** (2006). H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation. *J.Biol.Chem.* 281, 20036–20044.
- Thomas B. y Vince-Prue D.** (1997). *Photoperiodism in plants*. London, UK: Academic Press.
- Tian L. y Chen ZJ.** (2001). Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc Natl Acad Sci U.S. A.* 98, 200–205.
- 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.
- 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.
- Turck F., Roudier F., Farrona S., Martin-Magniette M.L., Guillaume E., Buisine N., Gagnot S., Martienssen RA., 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.
- Vaillant I. y Paszkowski J.** (2007). Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Curr Opin Plant Biol.* 10(5), 528-533.
- 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.
- van Ingen H., van Schaik FM, Wienk H., Ballering J., Rehmann H., Dechesne AC., Kruijzer JA., Liskamp RM., Timmers HT. y Boelens R.** (2008). Structural insight into the recognition of the H3K4me3 mark by the TFIID subunit TAF3. *Structure.* 16, 1245-1256.
- van Vugt JJ., Raney M., Campsteijn C. y Logie C.** (2007). The ins and outs of ATP-dependent chromatin remodeling in budding yeast: biophysical and proteomic perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 1769(3), 153-171.
- Vaziri H., Dessain SK. y Ng Eaton E.** (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 107, 149–159.
- Verdin E., Dequiedt F. y Kasler HG.** (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet.* 19, 286–293.
- Vermeulen M., Mulder KW., Denissov S., Pijnappel WW., van Schaik FM., Varier RA., Baltissen MP., Stunnenberg HG., Mann M. y Timmers HT.** (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell.* 131(1), 58-69.
- Wagner D. y Meyerowitz E.M.** (2002). *SPLAYED*, a novel SWI/SNF ATPase homolog, controls reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 12, 85–94.
- Wang JW., Czech B. y Weigel D.** (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell.* 138(4), 738-749.
- Wang X., Zhang Y., Ma Q., Zhang Z., Xue Y., Bao S. y Chong K.** (2007a). *SKB1*-mediated symmetric dimethylation of histone H4R3 controls flowering time in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 26(7), 1934-1941.
- Wang ZY. y Tobin EM.** (1998). Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell.* 93, 1207–1217.

- Weigel D., Alvarez J., Smyth DR., Yanofsky MF., y Meyerowitz EM.** (1992). *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*. 69, 843-859.
- Wenkel S., Turck F., Singer K., Gissot L., Le Gourrierc J., Samach A. y 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(11), 2971-2984.
- Werner JD., Borevitz JO., Uhlentaut NH., Ecker JR., Chory J. y Weigel D.** (2005). *FRIGIDA*-independent variation in flowering time of natural *Arabidopsis thaliana* accessions. *Genetics*. 170(3), 1197-1207.
- 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.
- Wilson RN., Heckman JW y Somerville CR.** (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol*. 100, 403-408.
- Wilson ZA., Morroll SM., Dawson J., Swarup R. y Tighe PJ.** (2001). The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant J*. 28, 27-39.
- Winicov I. y Bastola DR.** (1999). Transgenic overexpression of the transcription factor *alfin1* enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol*. 120(2), 473-480.
- Winicov I.** (2000). *Alfin1* transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. *Planta*. 210(3), 416-422.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson GV. y Provart NJ.** (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*. 2(1):e718.
- Wood A., Schneider J., Dover J., Johnston M. y Shilatifard A.** (2006). 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(37), 34739-34742.
- Wood A., Shukla A., Schneider J., Lee JS., Stanton JD., Dzuiba T., Swanson SK., Florens L., Washburn MP., Wyrick J., Bhaumik SR. y Shilatifard A.** (2007). Ctk complex-mediated regulation of histone methylation by COMPASS. *Molecular Cell Biol*. 27(2), 709-720.
- Wood CC., Robertson M., Tanner G., Peacock WJ., Dennis ES. y Helliwell CA.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(39), 14631-14636.
- Wu K., Malik K., Tian L., Brown D. y Miki B.** (2000). Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homolog in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 44, 167-176.
- Wu K., Zhang L., Zhou C., Yu CW. y Chaikam V.** (2007). HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*. 59(2), 225-234.
- Wu G., Park MY., Conway SR., Wang JW., Weigel D. y Poethig RS.** (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*. 138(4), 750-759.
- Wu G. y Poethig RS.** (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development*. 133(18), 3539-3547.
- Wysocka J., Swigut T., Xiao H., Milne TA., Kwon SY., Landry J., Kauer M., Tackett AJ., Chait BT., Badenhorst P., Wu C. y Allis CD.** (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. 442, 86-90.

- 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.
- Xiao T., Hall H., Kizer KO., Shibata Y., Hall MC., Borchers CH. y Strahl BD.** (2003). Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast. *Gen Dev.* 17(5), 654-663.
- Xu L. y Shen W.H.** (2008). Polycomb silencing of *KNOX* genes confines shoot stem cell niches in Arabidopsis. *Curr Biol.* 23, 18(24), 1966-1971.
- 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 YL., Li L., Wu K., Peeters AJM., Gage DA. y Zeevaart JAD.** (1995) The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 6640-6644.
- Xu YL., Li L., Gage DA. y Zeevaart JA.** (1999). Feedback Regulation of *GA5* Expression and Metabolic Engineering of Gibberellin Levels in Arabidopsis. *Plant Cell.* 927-936.
- 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 MF., Yang L., Wu G., Poethig RS. 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(2), 268-278.
- Yang CH., Chen LJ. y Sung ZR.** (1995). Genetic regulation of shoot development in Arabidopsis: role of the *EMF* genes. *Dev Biol.* 169(2), 421-435.
- Yang X., Makaroff CA. y Ma H.** (2003). The Arabidopsis *MALE MEIOCYTE DEATH1* gene encodes a PHD-finger protein that is required for male meiosis. *Plant Cell.* 15(6), 1281-1295.
- Yanovsky MJ. y Kay SA.** (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature.* 419, 308–312.
- Yoo SK., Chung KS., Kim J., Lee JH., Hong SM., Yoo SJ., Yoo SY., Lee JS. y Ahn JH.** (2005). *CONSTANS* Activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 139, 770–778.
- Yoshida N., Yanai Y., Chen L., Kato Y., Hiratsuka J., Miwa T., Sung ZR. y Takahashi S.** (2001). *EMBRYONIC FLOWER2*, a novel polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in Arabidopsis. *Plant Cell.* 13, 2471–2481.
- Yu H., Xu Y., Tan EL. y Kumar PP.** (2002). *AGAMOUS-LIKE 24*, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(25), 16336-16341.
- 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.
- Zeevaart JA.** (1983). Gibberellins and flowering. In the biochemistry and physiology of gibberellins. 2, 333–374.
- Zhang H. y van Nocker S.** (2002). The *VERNALIZATION INDEPENDENCE 4* gene encodes a novel regulator of *FLOWERING LOCUS C*. *Plant J.* 31(5), 663-673.

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., Rider SD Jr., Henderson JT., Fountain M., Chuang K., Kandachar V., Simons A., Edenberg HJ., Romero-Severson J. y Muir WM, Ogas J. (2008). The CHD3 remodeler PICKLE promotes trimethylation of histone H3 lysine 27. *J Biol Chem*. 283(33), 22637-22648.

Zhang X., Clarenz O., Cokus S., Bernatavichute YV., Pellegrini M., Goodrich J. y Jacobsen SE. (2007a). 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. (2007b). The *Arabidopsis* LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys 27 trimethylation. *Nat Struct Mol Biol*. 14, 869–871.

Zhang X., Bernatavichute YV., Cokus S., Pellegrini M. y Jacobsen SE. (2009). Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Gen Biol*. 10(6), R62.

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.