



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PAPEL DE AGL19 Y ACUMULACIÓN DE DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS EN LA  
RESPUESTA A LA VERNALIZACIÓN EN *Arabidopsis thaliana*

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**JUAN CARLOS JUNIOR YUSTIS RUBIO**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMENEZ  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ENTIDAD INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
OFICIO CPCB/786/2020  
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Biología Evolutiva del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de septiembre de 2020, aprobó el siguiente jurado para la presentación de examen para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, del estudiante YUSTIS RUBIO JUAN CARLOS JUNIOR, con número de cuenta: 311699898, con la tesis titulada "PAPEL DE AGL19 Y ACUMULACIÓN DE DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS EN LA RESPUESTA A LA VERNALIZACIÓN EN *Arabidopsis thaliana*", bajo la dirección del la DRA BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA  
Vocal: DRA. MAYRA FURLAN MAGARIL  
Secretario: DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
Suplente: DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA  
Suplente: DRA. SVETLANA SHISHKOVA

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 25 de noviembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

## Agradecimientos Institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo prestado para mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca nacional otorgada (CVU: 924627), la cual me permitió llevar a cabo mis estudios de maestría.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN206220; IN203220, IN200920 e IN211721, a cargo de las Dras. Berenice García Ponce de León, Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, Adriana Garay Arroyo, y Elena Alvarez-Buylla Rocés, a quienes les agradecemos su apoyo.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría académica de la Dra. Berenice García Ponce de León, a quien agradezco por su dirección y apoyo constantes durante la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutor, Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez y Dr. José Luis Reyes Taboada, cuyos comentarios, observaciones y sugerencias contribuyeron a mejorar este trabajo.

## Agradecimientos Personales

A la M. en C. Rosario Vega León y a la Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez por su apoyo académico y técnico para la realización del ensayo de CHIP-qPCR.

A la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, por su apoyo técnico para la realización de los ensayos de microarreglos.

Al Dr. Luis David Alcaraz Peraza por su apoyo y comentarios para el análisis de los ensayos de microarreglo.

A los miembros del jurado: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova, Dra. Mayra Furlan Magaril, Dr. José Luis Reyes Taboada, Dr. Luis David Alcaraz Peraza y Dra. Svetlana Shishkova, cuyos comentarios y sugerencias contribuyeron al mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. Diana Belén Sánchez Rodríguez por el apoyo logístico y administrativo, así como también a la Dra. Teresa Romero y Laura Rodríguez por la preparación de las soluciones y materiales utilizados para la realización de este trabajo.

# Índice

|   |     |
|---|-----|
| <b>Agradecimientos Institucionales</b> .....  | i   |
| <b>Agradecimientos Personales</b> .....   | ii  |
| <b>Resumen</b> .....  | I   |
| <b>Abstract</b> .....   | III |
| <b>1. Introducción</b> .....  | 1   |
| 1.1. Regulación Genética de la Transición a la Floración.....   | 2   |
| 1.1.1. Mecanismos de la vernalización para inducir la floración .....   | 9   |
| 1.1.1.1. Regulación epigenética de <i>FLC</i> durante el proceso de vernalización .....   | 10  |
| 1.1.1.2. El papel de los RNAs largos no codificantes en la represión de <i>FLC</i> durante la vernalización .....                       | 14  |
| 1.1.1.3. Papel de AGL19 y AGL24 en la transición a la floración por vernalización .....   | 18  |
| 1.2. Formación del meristemo de flor.....   | 20  |
| 1.3. Los genes MADS-box y su Regulación .....   | 21  |
| 1.3.1. Regulación transcripcional de los genes MADS-box mediante regiones regulatorias en <i>cis</i> y RNAs largos no codificantes..... | 24  |
| 1.3.2. Regulación co-transcripcional mediante <i>splicing</i> alternativo.....  | 24  |
| 1.3.3. Regulación postranscripcional y procesamiento de mRNA .....  | 28  |
| 1.3.4. Regulación postraduccional e interacciones proteína-proteína.....  | 30  |
| <b>2. Antecedentes</b> .....  | 33  |
| <b>3. Hipótesis</b> .....   | 39  |
| <b>4. Objetivo</b> .....  | 39  |
| <b>4.1. Objetivos Particulares</b> .....  | 39  |

|  |    |
|--|----|
| <b>5. Materiales y métodos</b> .....   | 40 |
| 5.1. Plantas y condiciones de crecimiento .....  | 40 |
| 5.2. Extracción y cuantificación de RNA .....  | 41 |
| 5.3. Análisis del microarreglo.....  | 41 |
| 5.4. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).....  | 43 |
| 5.5. Obtención, clonación y secuenciación de los transcritos alternativos de <i>AGL19</i> .....  | 46 |
| 5.6. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) .....  | 48 |
| <b>6. Resultados</b> .....   | 54 |
| 6.1. Identificación de genes regulados positivamente por <i>AGL19</i> después de la vernalización .....  | 54 |
| 6.2. Papel de <i>AGL19</i> en la regulación de algunos genes en la respuesta a la vernalización.....   | 59 |
| 6.3. Los mutantes <i>agl19-1</i> y <i>agl19-2</i> acumulan la misma cantidad del transcrito de <i>AGL19</i> que las plantas silvestres después del tratamiento de vernalización..... | 69 |
| 6.4. Las inserciones de T-DNA en los mutantes de <i>AGL19</i> alteran la acumulación de sus transcritos alternativos después de la vernalización ....                                | 71 |
| 6.5. Las inserciones de T-DNA modifican el enriquecimiento de H3K27me3 en la región 5' de <i>AGL19</i> .....   | 74 |
| 6.6. Clonación de <i>AGL19</i> y sus transcritos alternativos.....   | 75 |
| <b>7. Discusión</b> .....  | 78 |
| 7.1. Papel de <i>AGL19</i> en la regulación de genes involucrados en el proceso de vernalización y en día corto .....  | 78 |
| 7.2. <i>AGL19</i> regula a genes involucrados en la transición a la floración.....   | 83 |

|   |            |
|---|------------|
| 7.3. Efecto de las inserciones de T-DNA en la regulación de <i>AGL19</i> en tres mutantes alélicos.....                 | 87         |
| 7.4. Las inserciones de T-DNA modifican el ambiente epigenético dentro del locus de <i>AGL19</i> .....                  | 89         |
| <b>8. Conclusiones .....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>9. Perspectivas.....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>10. Referencias .....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>11. Figuras suplementarias.....</b>  | <b>115</b> |
| <b>12. Anexo 1: Artículo de difusión “La regulación genética de la floración” realizado durante esta maestría .....</b> | <b>116</b> |

## Resumen

A lo largo de su historia evolutiva las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten censar diferentes señales del ambiente, así como las propias de su desarrollo, para sincronizar el tiempo de la floración con las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de la descendencia. Dentro de la red de regulación genética que integra todas estas señales, los factores transcripcionales de la familia MADS-box, tienen un papel relevante. Uno de ellos, *AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19)*, actúa como un promotor de la floración en respuesta a la vernalización, un proceso mediante el cual las plantas florecen después de pasar por un largo periodo de frío. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual *AGL19* cumple con esta función. El presente trabajo se enfocó por una parte, en analizar mediante un enfoque transcriptómico el papel de *AGL19* en la regulación de genes posiblemente implicados en la respuesta a la vernalización, y por otra parte, a conocer más a fondo la expresión de dos transcritos alternativos de *AGL19* después de la vernalización, utilizando tres mutantes alélicos por inserción de T-DNA en este gen.

Los resultados muestran que *AGL19* regula positivamente a un gen que codifica para una E3 ubiquitín ligasa, *RING-H2 FINGER A1A (RHA1A)*, en respuesta a la vernalización y también se encontró que *AGL19* regula diferencialmente a otros genes MADS-box como *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* y *XAANTAL 2 (XAL2)* en las plantas cultivadas en día corto. Además, demostramos que las inserciones de T-DNA afectan los patrones de acumulación tanto del mensajero codificante

de *AGL19* como de dos de sus transcritos alternativos, posiblemente porque alteran la deposición de la marca epigenética de represión H3K27me3 sobre el primer exón-intrón del gen.

## Abstract

Flowering transition is one of the most broadly studied processes in plant development. Plants possess many mechanisms that allow them to sense developmental and environmental cues to synchronize the timing of flowering with the most optimal conditions. It has been shown that genes belonging to the highly conserved MADS-box family are important regulators of flowering transition. One of them is *AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19)* that promotes flowering in response to vernalization. Until now the precise role of *AGL19* in the vernalization process remained unknown. Therefore, the present work focused on studying genes regulated by *AGL19* to explain its role in this process. We found that *AGL19* is a positive regulator of the RING H2 protein *RHA1A*, an E3 ubiquitin ligase, that until now has not been implicated in any developmental process in *Arabidopsis*. It was also found that in short-day conditions *AGL19* regulates other known MADS-box genes, such as *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* and *XAANTAL 2 (XAL2)*. We also analysed two transcripts generated by alternative splicing of *AGL19* in three allelic mutants, and their abundance before and after vernalization. Finally, we investigated the effects of T-DNA insertions in the three mutant alleles of *AGL19* and found that they differentially modify the accumulation of *AGL19* and its alternative transcripts probably by modifying the enrichment of H3K27me3 repression mark in the first exon and intron region of this gene.

# 1. Introducción

Durante su ciclo de vida las plantas angiospermas anuales pasan por una serie de etapas de desarrollo cada una caracterizada por la identidad de los meristemos aéreos laterales, que son producidos a partir del meristemo apical aéreo (*shoot apical meristem*: SAM) (Poethig 1990). En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), el SAM produce hojas durante su etapa vegetativa, en esta etapa la floración se encuentra reprimida. La transición a la floración es el proceso por el que la planta pasa de un estado de crecimiento vegetativo a un estado de desarrollo reproductivo. Durante esta transición, el SAM se convierte en el meristemo de inflorescencia (MI), a partir del cual se producirán los meristemos de flor (MF) (Araki, 2001; Alvarez-Buylla et al. 2010). La coordinación de la transición de una fase vegetativa a una reproductiva está dada por una compleja red de regulación genética que las plantas han desarrollado a lo largo de su historia evolutiva. Esto les ha permitido censar y monitorear diferentes señales, tanto estacionales como propias del desarrollo de la planta, para sincronizar su desarrollo con las condiciones ambientales óptimas específicas para cada especie y que de esta forma se lleve a cabo la floración y posteriormente la producción de semillas (Amasino, 2010; Bratzel y Turck, 2015). De hecho, existe una gran variabilidad en los mecanismos de respuesta que permiten la transición a la floración entre las diferentes poblaciones naturales de *Arabidopsis*, las cuales muestran un alto grado de adaptación a señales como el fotoperiodo y la temperatura de los distintos hábitats (Gazzani et al. 2003; Lempe et al. 2005; Strange et al. 2011).

## 1.1. Regulación genética de la transición a la floración

Para que se pueda dar la transición a la floración, la planta integra tanto señales ambientales como fisiológicas mediante una red de regulación genética en la que participan ~300 genes (Bouché et al. 2016). Dentro de las señales conocidas se encuentran el fotoperiodo y la temperatura estacional, así como la edad de la planta, aunado a la regulación hormonal y el metabolismo de los carbohidratos (Srikanth y Schmid, 2011; Wahl et al. 2013). El conocimiento que tenemos sobre este proceso de desarrollo, se llevó a cabo inicialmente mediante la búsqueda de mutantes con un tiempo de floración alterado bajo condiciones de crecimiento específicas, para luego clonar los genes responsables del fenotipo (Koornneef, Hanhart, y van der Veen 1991; Zagotta et al. 1992; Koornneef et al. 1998). Mas recientemente, se ha analizado el comportamiento de genes conocidos bajo diferentes condiciones de crecimiento. Con base en esto, se han establecido “vías genéticas de floración” (Fornara, de Montaigu, y Coupland 2010). Sin embargo, aunque este enfoque ha facilitado el análisis y la comprensión de la floración, cabe mencionar que cada una de estas señales no actúan de forma independiente. A continuación, se describen brevemente:

El fotoperiodo es una de las señales ambientales que influye drásticamente en el tiempo de floración. Plantas como *Arabidopsis*, florecen más tempranamente en fotoperiodos de día largo (DL; 16h luz/8h oscuridad) comparadas con las que crecen en día corto (DC; 8h luz/16h oscuridad). El fotoperiodo de DL se detecta en las hojas mediante una cascada de señalización que involucra a los fotorreceptores y genes del ciclo circadiano como *GIGANTEA (GI)* (Mizoguchi et al. 2005). GI induce el transcrito de *CONSTANS (CO)* en conjunto

con FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1), una E3 ubiquitín ligasa; mientras que por la tarde los criptocromos promueven la estabilidad de CO al inhibir a CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1), una E3 ubiquitín ligasa, que junto con el complejo SUPPRESSOR OF PHYA-105 (SPA1, SPA3 y SPA4) ubiquitinan a CO y lo envían a degradación (Laubinger et al. 2006; Jang et al. 2008; L. J. Liu et al. 2008). Por lo tanto, la acumulación de CO sólo ocurre en DL, mientras que en día corto, es degradado rápidamente (L. Li et al. 2016). CO promueve la floración al activar la transcripción de dos proteínas de unión a fosfatidiletanolamina (*phosphatidylethanolamine-binding protein*, PEBP), *FLOWERING LOCUS T (FT)* y de su homólogo, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*. Las proteínas codificadas por estos genes viajan desde las hojas hasta el SAM, a través del floema. Ahí, se unen con FD, un factor de transcripción tipo bZIP, para activar los genes que inducen la transición a la floración (Pin y Nilsson, 2012) (Figura 1, Amarillo).

Cuando no hay inducción por el fotoperiodo de DL, las giberelinas (GAs) adquieren un papel preponderante. Las GAs son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladores del desarrollo y que promueven la floración en muchas plantas, incluida *Arabidopsis* (Davière y Achard, 2013). Mutaciones en los genes de biosíntesis o catabolismo de GAs, producen un fenotipo de floración tardía, especialmente en condiciones de día corto (Mutasa-Göttgens y Hedden 2009; Jung et al. 2012) (Figura 1, Naranja).

Como muchos otros organismos, las plantas transitan al estado reproductivo una vez que han alcanzado cierta madurez en su desarrollo. Los factores de transcripción tipo SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE (SPL, también llamadas SBP) tienen un papel

importante durante las transiciones del SAM en el desarrollo de las plantas (M. Xu et al. 2016). De forma interesante, la mayoría de los transcritos de los genes *SPL* son regulados negativamente por el microRNA *miR156*, cuyos niveles son elevados cuando la planta es joven y disminuyen progresivamente con la edad, permitiendo que los *SPL* se expresen (Wang, Czech, y Weigel, 2009). Al madurar la planta, los niveles de *SPL* aumentan, lo cual promueve la activación de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* y *FRUITFUL (FUL)* dos factores de transcripción con dominio MADS, así como de *LEAFY (LFY)* (Wang, Czech, y Weigel, 2009). *LFY*, junto con *APETALA1 (AP1)* y *CAULIFLOWER (CAL)*, le dan identidad al meristemo de flor e inician así la formación de los órganos florales (Ferrándiz et al. 2000; Blázquez et al. 2006) (Figura 1, Verde).

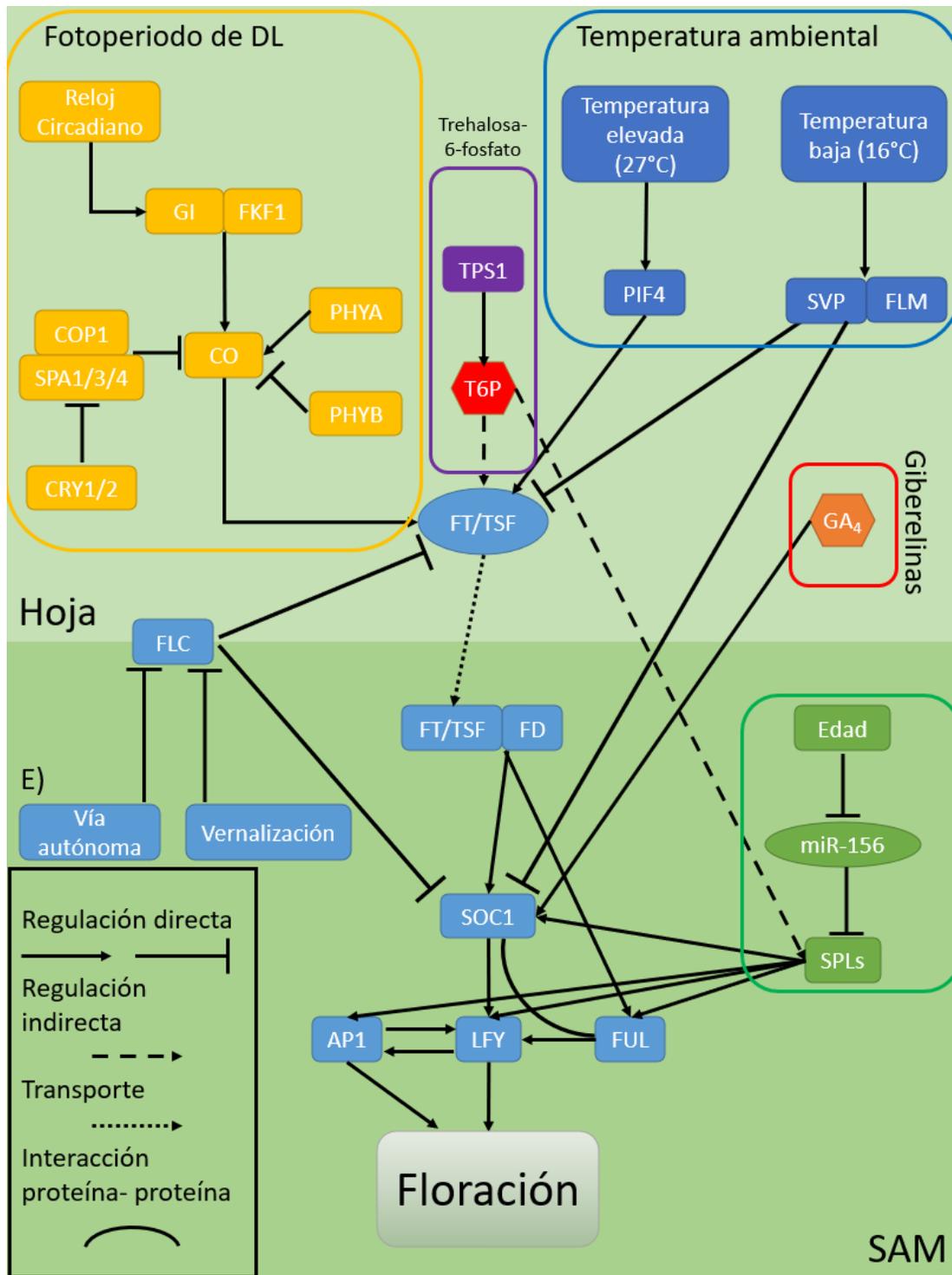
Aunque se conoce la importancia que tienen los carbohidratos en la fisiología de las plantas, en *Arabidopsis* se sabe relativamente poco acerca de su contribución en la regulación de la transición a la floración. Un ejemplo claro de esta regulación es el papel que tiene *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 (TPS1)* en este proceso. *TPS1* cataliza la formación de trehalosa-6-fosfato (T6P) a partir de glucosa-6-fosfato y uridina difosfato glucosa y su pérdida causa que *Arabidopsis* florezca de manera tardía, inclusive bajo fotoperiodo de DL. La T6P se encuentra en bajas concentraciones en la mayoría de las plantas y se ha sugerido que funciona como una molécula de señalización que informa acerca de la disponibilidad de los carbohidratos a otras rutas de señalización (Ponnu, Wahl, y Schmid, 2011) entre las que se encuentra la transición a la floración. T6P regula indirectamente a *FT* en las hojas y a *SPL3, 4 y 5* en el SAM (Wahl et al. 2013) (Figura 1, Morado).

Los mutantes de genes pertenecientes a la vía autónoma florecen de manera tardía independientemente del fotoperiodo (de ahí el nombre que se le dio), pero este fenotipo se complementa una vez que las plantas se vernalizan. Las proteínas de la vía autónoma actúan de manera general en el silenciamiento de *FLOWERING LOCUS C (FLC)* una vez que las plantas han alcanzado la madurez (Cheng et al. 2017; Wu et al. 2020). FLC es un factor de transcripción con dominio MADS que actúa como un potente represor de la floración al inhibir directamente la expresión de *FT* y *SOC1*, uniéndose directamente a sus respectivas regiones promotoras, evitando así que las plantas florezcan antes de tiempo (Michaels y Amasino, 1999). Para que la planta pueda transitar a la floración, *FLC* debe de ser reprimido mediante modificaciones de su cromatina, así como también mediante procesos que disminuyen la acumulación del mRNA de *FLC* (Cheng et al. 2017) (Figura 1).

La temperatura, es otra señal que influye en la floración de las plantas. A temperatura elevada (27°C) *Arabidopsis* florece más tempranamente que plantas crecidas a 23°C y esto es debido en parte a un aumento en la expresión de *FT*. Se ha demostrado que PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4), un factor de transcripción con un motivo hélice-bucle-hélice, es un regulador positivo de *FT* el cual es capaz de unirse directamente a su promotor (Kumar et al. 2012). Cuando las plantas crecen con alta temperatura existe una menor cantidad de nucleosomas con la variante de la histona H2A, H2A.Z, en el promotor de *FT*. H2A.Z se ha implicado en el mantenimiento de promotores de genes quiescentes en un estado transcripcional “preparado” para activarse cuando se den las condiciones necesarias.

El recambio de H2A.Z relaja la estructura de la cromatina y permite una unión más eficaz de PIF4, así como su activación transcripcional (Kumar y Wigge 2010) (Figura 1, Azul).

En *Arabidopsis*, la temperatura óptima para su desarrollo es de  $\sim 23^{\circ}\text{C}$ , mientras que a temperaturas más bajas ( $\sim 16^{\circ}\text{C}$ ), la floración se retrasa. Los genes involucrados en la percepción de los cambios sutiles de temperatura se han incluido en la llamada vía termosensora (Capovilla, Schmid, y Posé 2015). A bajas temperaturas, *FT* así como *SOC1* son reprimidos por un complejo represor que incluye a dos factores de transcripción con dominio MADS, SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) y FLOWERING LOCUS M (FLM) (Figura 1, Azul).



**Figura 1.** La transición a la floración involucra la integración de señales externas y endógenas. La sincronización de la transición a la floración es regulada por una intrincada red de regulación genética que monitorea cambios en el ambiente, así como el desarrollo mismo de la planta, para asegurar que la floración ocurra en las condiciones más apropiadas para maximizar su éxito reproductivo. Fotoperiodo de DL: Amarillo, Gibberelinas: Naranja, Desarrollo: Verde, Trehalosa-6-fosfato: Morado, Temperatura ambiental: Azul.

Para fines de este trabajo, se ahondará acerca del papel de la vernalización en la floración en el siguiente apartado.

### 1.1.1. Mecanismos de la vernalización para inducir la floración

Dentro de las señales ambientales que la planta es capaz de censar para coordinar su etapa reproductiva con condiciones ambientales más favorables, se encuentra la vernalización (Alexandre y Hennig, 2007; Bloomer y Dean, 2017). Plantas como *Arabidopsis*, requieren de mecanismos para impedir que la planta florezca antes o durante el invierno, pero que le permita florecer en la primavera, cuando las condiciones ambientales son más favorables (Alexandre y Hennig, 2008).

Estudios realizados en poblaciones naturales de *Arabidopsis* han permitido describir a aquellas poblaciones que necesitan pasar por un proceso de vernalización para florecer, así como a aquellas que no lo requieren, pero sí lo promueve (Shindo et al. 2005; Luo y He 2020). Dicha variación está dada por la presencia de distintos alelos de dos genes: *FLC* y *FRIGIDA (FRI)* (Bloomer y Dean 2017). Como ya se ha mencionado anteriormente, *FLC* es un factor de transcripción con dominio MADS que actúa como un represor de la floración al reprimir directamente la expresión de *FT* y *SOC1* (Helliwell et al. 2006). *FRI* es una proteína con dos dominios de hélice superenrollada que forma un complejo de activación transcripcional conocido como FRIGIDA-Complex (*FRI-C*), el cual es un activador de *FLC* (Choi et al. 2011). La traducción de la proteína *FRI* en plantas con alelos funcionales de este gen resulta en el enriquecimiento de la proteína HUMAN WDR5 (WD40 REPEAT) HOMOLOG A (*ATWDR5a*) en el locus de *FLC*, que en conjunto con otras proteínas, incrementa la acumulación de la H3K4me3, una marca de histonas relacionada con la activación transcripcional (Choi et al. 2011). La activación completa de *FLC* requiere también de la

actividad de proteínas metiltransferasas de histonas como ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 (ATXR7), HOMOLOGUE OF TRITHORAX 1 (ATX1), ATX2, así como también de SET DOMAIN GROUP 8 (SDG8), la cual es requerida para la tri- y dimetilación de la H3K36, que está relacionada con la elongación transcripcional (Wu et al. 2015). Para poblaciones naturales de Arabidopsis con una proteína funcional de FRI es necesario que pasen por un periodo de vernalización para florecer, ya que solo de esta forma se reprime de manera estable la expresión de *FLC* (Henderson y Dean, 2004). En las poblaciones naturales de Arabidopsis que no requieren necesariamente de un periodo de vernalización para florecer, las plantas presentan mutaciones en el gen *FRI* y los niveles de expresión *FLC* disminuyen mediante mecanismos de represión asociados a la vía autónoma (Gazzani et al. 2003).

A continuación se describe el proceso de silenciamiento de *FLC* durante la vernalización.

#### 1.1.1.1. *Regulación epigenética de FLC durante el proceso de vernalización*

La represión de *FLC* por vernalización es un proceso altamente regulado, en el cual diferentes complejos proteicos actúan e interactúan en distintos momentos para asegurar el silenciamiento estable de *FLC* una vez que las plantas han regresado a temperaturas más cálidas (Yang et al. 2017; Luo y He 2020).

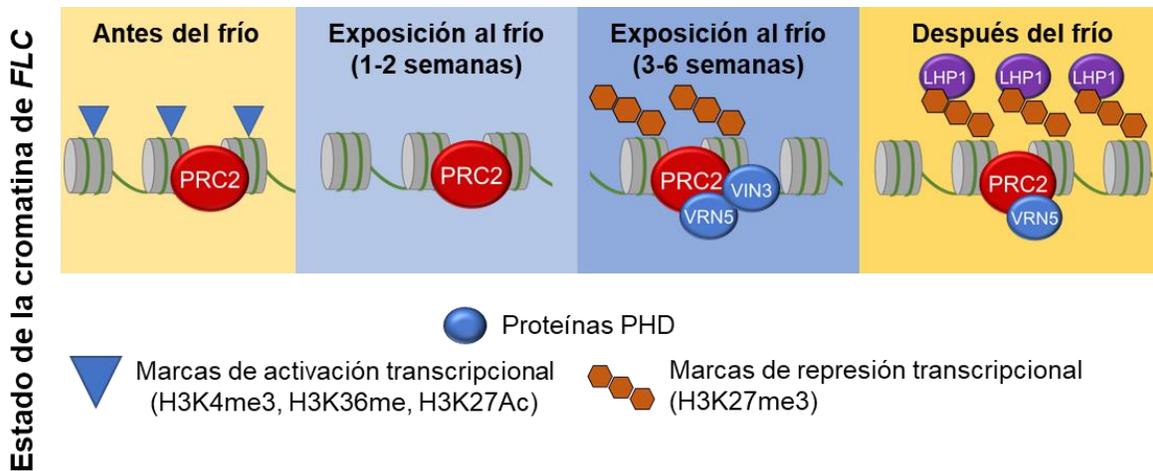
Antes de que las plantas pasen por un proceso de vernalización, el locus de *FLC* se encuentra en un estado de transcripción activa y sus niveles de expresión son elevados. Esto es debido a que el FRI-C promueve y cataliza la deposición de marcas de cromatina relacionadas con altos niveles de expresión genética, como lo son la H3K4me3, H3K36me3 y

la acetilación de histonas H3 y H4 en varios aminoácidos cerca del sitio de inicio de la transcripción de *FLC* (Choi et al. 2011; Li, Jiang, y He 2018). También se ha descrito que algunos genes que son parte de *FRI-C*, como *FLC EXPRESSOR (FLX)*, *FLX-LIKE4 (FLX4)*, *FRI ESSENTIAL1 (FES1)* y *SUPPRESSOR OF FRI4 (SUF4)* actúan para establecer los niveles de expresión basales de *FLC*, aún en poblaciones naturales de *Arabidopsis* que no presentan un alelo activo de *FRI*, como es el caso de Col-0 (Ding, Kim, y Michaels 2013). Para que la represión inicial se lleve a cabo es necesario que ocurra un cambio dinámico en la cromatina de *FLC* de un estado activo a uno reprimido, es decir, es necesaria la remoción de las marcas epigenéticas de activación (H3K4me3, H3K36me3, etc.) y la subsecuente deposición de marcas de represión (H3K27me3). La primera etapa de la represión de *FLC* ocurre de manera local dentro de una región de 3 nucleosomas, localizada en el borde entre el primer exón e intrón de *FLC*. A esta región se le conoce como la región de nucleación. Dentro de esta región existe una secuencia regulatoria en *cis* de 47 pb con dos motivos RY de 6pb denominado *Cold Memory Element (CME)*. Dos reguladores epigenéticos, VP1/ABI3-LIKE 1 (VAL1) y VAL2, se unen directamente los motivos RY del CME y reclutan a su vez a dos proteínas desacetilasas de histonas HISTONE DEACETYLASE 9 (HDA9) y HDA19 a la región de nucleación (Qüesta et al. 2016; Yuan et al. 2016; Zeng et al. 2020). La reducción en los niveles de acetilación de histonas es necesaria para el establecimiento de la represión inicial de *FLC* y se ha demostrado que HDA9 es necesaria para que se lleve a cabo el intercambio dinámico de las marcas de acetilación de H3K27 (H3K27ac) por la trimetilación de H3K27 (H3K27me3) en los estadios iniciales de la vernalización (Zeng et al. 2020).

Las proteínas pertenecientes al grupo Polycomb (*Polycomb group Proteins*, PcG), reguladores epigenéticos ampliamente estudiados en *Arabidopsis* (Kim y Sung 2014), son las encargadas de catalizar la trimetilación de H3K27 sobre el locus de *FLC* durante la vernalización. Esta deposición de H3K27me3 sobre el locus de *FLC* es mediada por un complejo represor de proteínas PcG, conocido como *Polycomb repressive complex 2* (PRC2). Este complejo PRC2 consta de distintas subunidades: proteínas homólogas de la metiltransferasa de *Drosophila* E(z), CURLY LEAF (CLF) y SWINGER (SWN), así como los componentes estructurales VERNALIZATION2 (VRN2), FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) y MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1) (De Lucia et al. 2008; Mozgova y Hennig 2015). Antes de la vernalización este complejo PRC2 se encuentra posicionado en el extremo 5' del locus de *FLC* en la región de nucleación (De Lucia et al. 2008; Yang et al. 2017). Después de que las plantas han pasado por un periodo prolongado de frío se induce una proteína con dominio PHD, VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3), la cual se heterodimeriza con otra proteína PHD, VIN3-LIKE 1 (VIL1)/VERNALIZATION 5 (VRN5). Este complejo VIN3/VRN5 se une a PRC2 y a través de la interacción de VAL1/2 con MSI1, el complejo PHD-PRC2 es reclutado a la región de nucleación (Qüesta et al. 2016; Yuan et al. 2016). Este nuevo complejo PHD-PRC2 es enriquecido localmente solamente en la región de nucleación junto con el complejo PCR2 que se encontraba previamente unido en esta región. VAL1/2 también interactúan con una proteína lectora de marcas epigenéticas LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1). LHP1 es capaz de unirse a H3K27me3 y al complejo PRC2 mediante su interacción directa con MSI1 y antes del frío es reclutada a la región de nucleación mediante la interacción de MSI1 con VAL1/2 para promover la acumulación de

H3K27me3 en nucleosomas presentes en la región de nucleación (Derkacheva et al. 2013). Durante la vernalización la marca H3K27me3 se encuentra localizada solamente en la región de nucleación y VAL1/2 actúan de forma parcialmente redundante para reclutar al complejo PHD-PRC2 a esta región, lo cual genera un aumento local en la acumulación de H3K27me3 (Yuan et al. 2016) (Figura 2).

Una vez que las plantas regresan a condiciones cálidas, se reduce la abundancia de VIN3 y ya no forma parte del complejo PHD-PRC2. Sin embargo, la proteína VRN5 aún continua asociada al complejo PRC2, por lo que el complejo PHD (VRN5)-PRC2 es capaz de catalizar trimetilación de H3K27 en el locus de *FLC* en condiciones cálidas (De Lucia et al. 2008). LHP1 tiene un papel importante en el mantenimiento y expansión de H3K27me3 cuando las plantas regresan a condiciones cálidas (Jiang y Berger 2017; Yang et al. 2017). Previamente se había reportado que LHP1 tenía un papel en el proceso de nucleación, sin embargo, mutantes *lhp1* presentaban nucleación eficiente a diferencia de mutantes *vin3* y *vrn2* (Yuan et al. 2016; Yang et al. 2017). En condiciones cálidas LHP1 se esparce a lo largo del locus de *FLC* y por lo tanto es posible que el complejo VAL1/2-LHP1 lea nucleosomas marcados con H3K27me3 y mediante su interacción con el complejo PHD (VRN5)-PRC2 catalice trimetilación de H3K27 en nucleosomas adyacentes en un asa de retroalimentación positiva que permite la acumulación de H3K27me3 en todo el locus de *FLC*, lo cual resulta en una represión estable en condiciones cálidas (Yuan et al. 2016) (Figura 2).



**Figura 2. Cambios en el estado de la cromatina de *FLC* antes, durante y posterior a la vernalización.** La represión de *FLC* es un proceso secuencial en el cual participan diferentes componentes asociados al complejo PRC2. Antes del frío, *FLC* se encuentra activo y su cromatina presenta marcas de activación transcripcional. Durante la exposición al frío la expresión de *FLC* se reduce y un complejo PHD-PRC2 se enriquece en la región de nucleación y este complejo cataliza de manera local la trimetilación de la H3K27. Una vez que las plantas regresan a condiciones más cálidas el complejo VRN5(PHD)-PRC2 se esparce en todo el locus de *FLC* depositando grandes cantidades de H3K27me3 y el factor epigenético LHP1 ayuda tanto al esparcimiento de esta marca, como a mantener una represión estable de *FLC* en subsecuentes divisiones mitóticas. Figura modificada de García Ponce de León et al. (2020).

Además de la represión de *FLC* mediada por cambios en la composición de su cromatina, evidencia reciente señala que cambios estructurales del locus de *FLC* son importantes para el establecimiento de la represión inicial por vernalización. Antes de la vernalización existe un bucle en el locus de *FLC* generado por la interacción de dos regiones que flanquean al locus de *FLC* en sus regiones 5' y 3', respectivamente. La formación de este bucle parece ser independiente de los niveles de expresión de *FLC*, la represión mediada por proteínas PcG, así como también del contexto genómico donde se encuentre *FLC* (Crevillén et al. 2013). En las etapas iniciales de la vernalización, esta interacción entre las dos regiones flanqueantes se reduce y el bucle desaparece. Esta alteración del bucle coincide con los momentos iniciales de la vernalización donde los niveles de expresión de *FLC* disminuyen y

la acumulación de transcritos en anti sentido de *FLC* aumenta. Se ha propuesto que la alteración de este bucle es uno de los primeros pasos en el cambio de *FLC* de un estado transcripcional activo a uno reprimido (Crevillén et al. 2013).

#### 1.1.1.2. *El papel de los RNAs largos no codificantes en la represión de FLC durante la vernalización*

Además de los mecanismos de represión mediados por proteínas PcG se tiene evidencia de la contribución que tienen transcritos no codificantes producidos a partir del locus de *FLC* en su represión durante la vernalización (Figura 3). En las etapas iniciales de la vernalización se transcriben un grupo de RNAs largos no codificantes en antisentido (lncRNA) a partir de un promotor en la región 3' de *FLC* denominados colectivamente como *COLD INDUCED LONG ANTISENSE INTRAGENIC RNAs (COOLAIR)* (Swiezewski et al. 2009). Estos lncRNAs presentan splicing alternativo y son poliadenilados diferencialmente (Marquardt et al. 2014). Existen tres clases principales de lncRNAs de *COOLAIR*: uno que no es procesado por *splicing* y abarca todo el locus de *FLC*, otro procesado por *splicing* y que está poliadenilado proximalmente (cerca del sexto exón de *FLC*) y finalmente uno que es también procesado por *splicing* y presenta una poliadenilación distal (río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *FLC*) (Swiezewski et al. 2009; Bloomer y Dean, 2017). La expresión de los RNAs de *COOLAIR* correlaciona con una reducción en la expresión de *FLC* y se tiene evidencia de que *COOLAIR* interactúa físicamente con el locus de *FLC* (Csorba et al. 2014). Los lncRNAs de *COOLAIR* con poliadenilación proximal reprimen la expresión de *FLC* mediante un mecanismo que involucra la desmetilación de H3K4me2 por la desmetilasa de histonas FLD (F. Liu et al. 2007;

2010) y una reducción coordinada de la tasa de iniciación y elongación de la transcripción de *FLC* (Z. Wu et al. 2016). Esta reducción en la transcripción de *FLC* promueve el uso de los sitios de poliadenilación proximal de *COOLAIR* lo cual genera un mecanismo de retroalimentación positiva para *COOLAIR*, el cual mantiene un nivel de expresión bajo de *FLC* (Marquardt et al. 2014). Para que la represión inicial de *FLC* se lleve a cabo tiene que haber un intercambio dinámico en la composición de su cromatina de un estado activo a uno reprimido y parece ser que *COOLAIR* juega un papel importante en este proceso ya que la alteración de *COOLAIR* inhibe la reducción mediada por frío de H3K4me3 y H3K36me3, y su subsecuente reemplazo con H3K27me3 (Csorba et al. 2014). Existe evidencia de que una proteína de unión a RNA involucrada en la vía autónoma, FLOWERING CONTROL LOCUS A (FCA), interactúa con CLF, el componente catalítico del complejo PRC2, y se une a *COOLAIR* lo cual permite que CLF deposite H3K27me3 en el locus de *FLC*. La pérdida de *COOLAIR* genera una reducción en el enriquecimiento de FCA y CLF, lo cual a su vez disminuye los niveles de H3K27me3 en *FLC* (Tian et al. 2019). Aunque no se le ha asignado una función clara al transcrito con poliadenilación distal de *COOLAIR* se piensa que también actúa para reprimir a *FLC* y se ha encontrado que las estructuras secundarias que forma presentan una conservación evolutiva, lo cual podría ser un indicio de una posible función regulatoria (Hawkes et al. 2016). Mediante análisis de hibridación *in situ* de fluorescencia de una sola molécula se encontró que el transcrito de *COOLAIR* sin *splicing* se expresa de manera mutuamente exclusiva con el transcrito de *FLC* (Rosa, Duncan, y Dean, 2016). También se demostró que la formación de un asa-R (un híbrido de DNA y RNA) estabilizada por una proteína con un homeodominio, AtNDX, en la región heterocromática del promotor de

*COOLAIR* inhibe la expresión de *COOLAIR* y por lo tanto promueve la expresión de *FLC* (Sun et al. 2013). La regulación mediada por AtNDX de este asa-R parece ser independiente del asa que se forma en *FLC* antes de la vernalización (Crevillén et al. 2013; Sun et al. 2013).

Además de *COOLAIR*, existe otro transcrito no codificante que se produce en sentido a partir de un promotor en el primer intrón de *FLC*, que se denominó *COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA (COLDAIR)* (Heo y Sung, 2010). Este transcrito presenta un *cap* en su extremo 5' pero no está poliadenilado y es inducido por frío, aunque más tarde que *COOLAIR*, alcanzando un pico de expresión aproximadamente a las 3 semanas de vernalización (Kim, Xi, y Sung, 2017). *COLDAIR* interactúa físicamente con el complejo PRC2 para promover la acumulación de H3K27me3 en el locus de *FLC* durante el proceso de vernalización y se ha demostrado que cuando se inhibe su expresión disminuye el silenciamiento de *FLC* (Heo y Sung, 2010). *COLDAIR* interactúa con un tercer lncRNA producido en el mismo sentido de *FLC* llamado *COLD OF WINTER-INDUCED NONCODING RNA FROM THE PROMOTER (COLDWRAP)*. Mientras que *COLDAIR* facilita el enriquecimiento de PRC2 en la región de nucleación durante las etapas iniciales de la vernalización, *COLDWRAP* reprime a *FLC* en las etapas finales al promover la formación de un bucle de cromatina represivo entre el promotor de *FLC* y la región donde se transcribe *COLDAIR* y mediante una interacción directa con PRC2 contribuye al esparcimiento del complejo en todo el locus de *FLC* (Dong Hwan Kim y Sung, 2017).

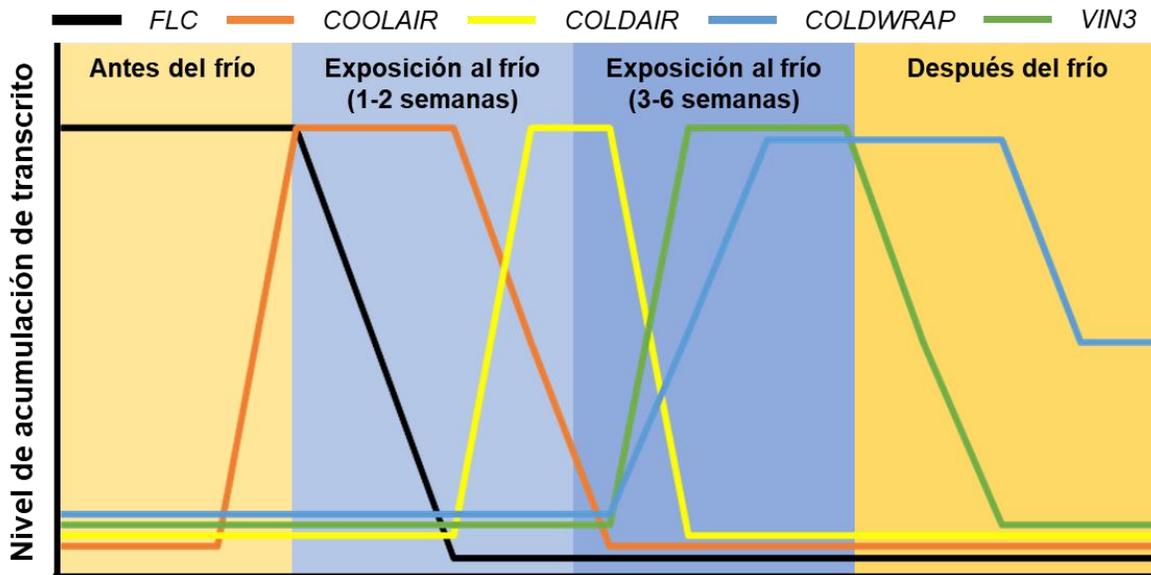


Figura 3. Los transcritos no codificantes producidos a partir del locus de *FLC* contribuyen a su represión durante el proceso de vernalización. Antes de la vernalización existen niveles elevados de acumulación del transcrito de *FLC*. Después de la exposición al frío *COOLAIR* comienza a expresarse y los niveles del transcrito de *FLC* disminuyen. Un periodo prolongado de frío promueve la expresión de *COLDAIR* el cual contribuye con la represión de *FLC* mediada por complejos PcG PRC2, junto con *COLDWRAP*. Estos mecanismos mantienen reprimido de forma estable a *FLC* una vez que las plantas regresan a condiciones óptimas de temperatura. Figura modificada de García Ponce de León et al. (2020).

### 1.1.1.3. Papel de *AGL19* y *AGL24* en la transición a la floración por vernalización

El estudio de la transición a la floración en respuesta a la vernalización se ha centrado en el estudio de *FLC* y sus mecanismos de represión (Baulcombe y Dean, 2014). Sin embargo, se sabe que poblaciones naturales de plantas que presentan alelos no funcionales de *FRI* o alelos de *FLC* con bajos niveles de expresión (así como también plantas mutantes en *FLC*), mantienen su capacidad de respuesta a la vernalización (Shindo et al. 2005), por lo cual deben existir otros genes involucrados en la transición a la floración.

*AGL19* y *AGL24* son dos genes que codifican para factores de transcripción con dominio MADS al igual que *FLC*, pero a diferencia de este último, ambos son inducidos por la

vernalización y actúan como inductores de la floración (Figura 4) (Michaels et al. 2003; Schönrock et al. 2006).

*AGL19* también es regulado por un complejo de proteínas PcG, pero a diferencia de *FLC*, *AGL19* se encuentra parcialmente reprimido durante el desarrollo vegetativo (Schönrock et al. 2006). Igualmente, *AGL19* es regulado negativamente por una desacetilasa de histonas, HDA9, lo cual previene una floración precoz en condiciones de DC (Kim et al. 2013; Kang et al. 2015). El papel de *AGL19* en vernalización se resume en los antecedentes de este proyecto.

*AGL24* es homólogo a *SVP* (Pařenicová et al. 2003) y participa como un activador de la floración bajo diferentes condiciones de crecimiento, entre ellas, en respuesta a la vernalización (Michaels et al. 2003). Al igual que con *AGL19*, se demostró que *AGL24* actúa de forma independiente a la represión de *FLC* (Michaels et al. 2003). Interesantemente, *AGL24* también es reprimido por HDA9 y por un complejo PcG (Zeng et al. 2020).

Actualmente no existe información acerca de los blancos de regulación de *AGL19* y *AGL24* durante el proceso de vernalización o si existe algún tipo de interacción genética entre ellos.

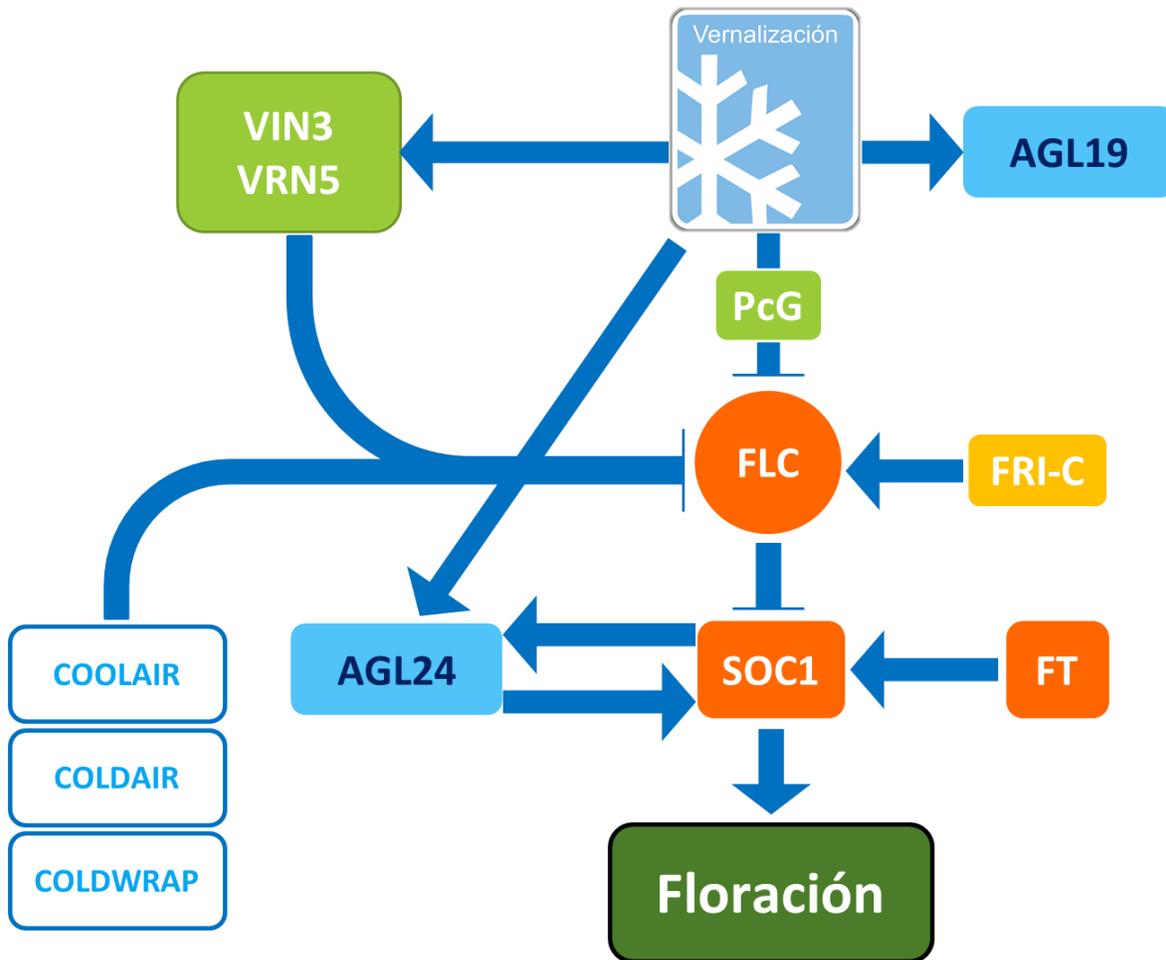


Figura 4. La vernalización involucra la represión de *FLC* por diferentes mecanismos, así como también la activación de otros genes. Durante la vernalización, *FLC* es reprimido por mecanismos epigenéticos de remodelación de cromatina que incluyen a proteínas PcG y lncRNAs. A diferencia de *FLC*, *AGL19* y *AGL24* son inducidos por vernalización y actúan como promotores de la transición a la floración. La activación de *FLC* por FRI-C solo ocurre en las poblaciones naturales anuales de invierno.

## 1.2. Formación del meristemo de flor

La red de floración confluye en la expresión de *LFY* y *AP1* (Torti y Fornara, 2012) que junto con *CAULIFLOWER (CAL)* (Saddic et al. 2006) le dan identidad al meristemo de flor (MF). *LFY* activa a *LATE MERISTEM IDENTITY1 (LMI1)*, un factor de transcripción tipo HD-Zip de clase I, y en combinación con este induce la expresión de *CAL*. A su vez *LFY* y *CAL*, en parte junto con *LMI2*, inducen a *AP1* y este regula a *LFY*, en un asa de retroalimentación positiva para mantener la identidad del MF (Pastore et al. 2011). La inducción de *AP1* por su parte, reduce la expresión de *SOC1*, *AGL24*, *SVP* y *XAL2* en el MF, de forma que pueda mantenerse su identidad para su posterior diferenciación en los órganos florales (Liu et al. 2007; Gregis et al. 2008; Pérez-Ruiz et al. 2015).

## 1.3. Los genes MADS-box y su regulación

En esta sección se ahondará más sobre la familia de factores transcripcionales MADS-box, los cuales están involucrados en muchos procesos de desarrollo en todos los grupos de eucariontes, y tienen relevancia en la transición a la floración (Saedler et al. 2001; Martínez-Castilla and Alvarez-Buylla 2003; Smaczniak et al. 2012).

Dentro de la familia de genes MADS-box existen dos linajes, tipo I y tipo II, aunque en plantas sólo los de tipo II han sido extensamente caracterizados (Parenicová et al. 2003). Las proteínas de tipo II poseen una estructura modular conocida como MIKC, la cual presenta el dominio de unión a DNA (MADS) en su región N-terminal, seguido por el dominio I (*Intervening/Intermedio*) y por el dominio K (*Keratin-like*) que están involucrados en la

formación de dímeros y formación de complejos proteicos más grandes, y finalmente un dominio variable C-terminal, que parece tener un papel en la formación de complejos proteicos y regulación transcripcional (Lai et al. 2019). A su vez estos genes están clasificados en dos tipos, MIKC<sup>C</sup> (canónicos) y MIKC\*, que presentan diferencias en una subregión del dominio K (Theißen y Gramzow, 2015).

Se tiene una gran cantidad de evidencia (especialmente en Arabidopsis) que coloca a estos factores como importantes reguladores del proceso de floración e interesantemente, pueden actuar ya sea como activadores o represores de dicho proceso (Saedler et al. 2001; Martinez-Castilla and Alvarez-Buylla 2003; Smaczniak et al. 2012) (Tabla 1).

**Tabla 1. Genes MADS-box (MIKC<sup>C</sup>) involucrados en el proceso de transición a la floración.**

| Nombre   | Función en transición a la floración | Referencia  |
|--|--------------------------------------|---|
| <i>AGAMOUS-LIKE 6 (AGL6)</i>                                   | Activador                            | Koo et al., 2010; Yoo et al., 2011                                    |
| <i>XAANTAL1 (XAL1) / AGL12</i>                                 | Activador                            | Tapia-Lopez et al., 2008  |
| <i>XAANTAL2 (XAL2) /AGL14</i>                                  | Activador                            | Pérez-Ruiz et al. 2015  |
| <i>AGL15</i>   | Represor                             | Heck et al., 1995;<br>Fernandez et al., 2000;<br>Harding et al., 2003 |
| <i>AGL17</i>   | Activador                            | Han et al., 2008  |
| <i>AGL18</i>   | Represor                             | Adamczyk et al., 2007   |
| <i>AGL19</i>   | Activador                            | Schönrock et al., 2006  |
| <i>SUPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)/ AGL20</i> | Activador                            | Lee et al., 2000; Moreno-Risueno et al., 2010                         |
| <i>AGL24</i>   | Activador                            | Michaels et al., 2003   |
| <i>FLOWERING LOCUS C (FLC) /AGL25</i>                          | Represor                             | Michaels and Amasino, 1999; Chiang et al., 2009; Deng et al., 2011    |
| <i>FLOWERING LOCUS M (FLM)/MADS AFFECTING</i>                  | Represor                             | Ratcliffe et al., 2001; Ratcliffe et al., 2003                        |

|   |           |                            |
|---|-----------|----------------------------|
| <i>FLOWERING 1 (MAF1) /<br/>AGL27</i>   |           |                            |
| <i>MAF2</i>                             | Represor  |                            |
| <i>MAF3</i>                             | Represor  |                            |
| <i>MAF4</i>                             | Represor  |                            |
| <i>MAF5</i>                             | Activador | Ratcliffe et al., 2003     |
| <i>AGL28</i>                            | Activador | Yoo et al., 2006           |
| <i>AGL42</i>                            | Activador | Dorca-Fornell et al., 2011 |
| <i>AGL71</i>                            | Activador | Dorca-Fornell et al., 2011 |
| <i>AGL72</i>                            | Activador | Dorca-Fornell et al., 2011 |
| <i>SHORT VEGETATIVE PHASE<br/>(SVP)</i> | Represor  | Hartmann et al., 2000      |

Otros genes MADS-box que participan en la transición a la floración y hasta ahora no han sido mencionados son: *XAANTAL1* (*XAL1*) que actúa como un activador de la floración en condiciones de DL, pero lo hace de forma parcialmente independiente de los genes conocidos (Tapia-López et al. 2008) y *XAL2* (miembro del clado filogenético de *SOC1* y *AGL19*) que actúa como un inductor de la floración principalmente en condiciones de DC y en respuesta a giberelinas. Igualmente se probó que *XAL2* es un regulador positivo de *SOC1* y de *AGL24* y que además tiene un papel en el mantenimiento y determinación del MF (Pérez-Ruiz et al. 2015).

Con base en la información actual de la regulación genética de la transición a la floración, es claro que los genes MADS-box tienen un papel fundamental en la regulación de este proceso y esto es debido a las distintas interacciones entre los diferentes genes MADS-box, así como su interacción con otros componentes de regulación. La capacidad de esta familia de factores de transcripción para actuar como activadores o represores les confiere a las plantas una enorme plasticidad para responder a los diferentes estímulos ambientales, y así transitar al estado reproductivo en las condiciones óptimas (Gramzow y Theissen 2010).

Existe evidencia de que los genes MADS-box son regulados de diferentes formas: transcripcionalmente mediante la unión de distintos factores de transcripción a regiones promotoras e intrónicas; postranscripcionalmente, mediante el procesamiento de su RNA, epigenéticamente mediante la modificación y remodelación de la cromatina, regulación por RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y micro-RNAs (miRNAs), así como regulación postraduccional al nivel de sus proteínas (Smaczniak et al. 2012; Syed et al. 2012; Chamala et al. 2015; Jiang, 2015; Lai et al. 2019).

### **1.3.1. Regulación transcripcional de los genes MADS-box mediante regiones regulatorias en *cis* y RNAs largos no codificantes**

En *Arabidopsis* todos los genes MADS-box de tipo MIKC<sup>C</sup>, con excepción de *APETALA3* y *AGL15*, presentan al menos un intrón con un tamaño mayor a 500 pb (Schauer et al. 2009). *AGAMOUS* (*AG*), un gen homeótico floral de clase C, fue el primer gen de *Arabidopsis* en el cual se demostró que dentro del segundo intrón (el más largo) se encontraban cajas reguladoras que conferían una expresión específica espacio-temporal, y que eran necesarios para su activación, así como también su represión (Sieburth y Meyerowitz, 1997). Igualmente, se demostró que el segundo intrón de *AG* era suficiente para dirigir la expresión de un reportero con una secuencia promotora mínima (Hong et al. 2003). También se sabe que dentro de este intrón de *AG* existen elementos de regulación que restringen su expresión a los órganos reproductivos de la flor (Deyholos y Sieburth, 2000).

Más recientemente se demostró que el segundo intrón de *AG* produce un ncRNA que reprime su expresión en las hojas a través del reclutamiento de proteínas PcG (Wu et al.

2018). Además de *AG*, se tiene evidencia de que *FLC* y *SEEDSTICK (STK/AGL11)* también tienen secuencias de regulación importantes dentro del primer intrón largo (Sheldon et al. 2002; Kooiker et al. 2005), así como también *AGL6*, *AGL13* (Schauer et al. 2009) y *AGL24* (Hussain et al. 2019).

### 1.3.2. Regulación co-transcripcional mediante *splicing* alternativo

Recientemente se ha demostrado la importancia que tiene la regulación co-transcripcional de los genes MADS-box y específicamente el papel que tiene el *splicing* alternativo en la regulación y función de algunos de estos genes involucrados en la transición a la floración (Wang et al. 2019).

El *splicing* alternativo es un fenómeno mediante el cual un solo gen es capaz de generar múltiples isoformas a partir de su transcrito primario. *FLM* es un factor de transcripción con dominio MADS que junto con *SVP* actúa como un represor de la transición a la floración (J. H. Lee et al. 2007). *FLM* puede dar lugar a dos isoformas de su proteína producto de un proceso de *splicing* alternativo dependiente de la temperatura (Lee et al. 2013). En condiciones de temperatura baja (16°C), se genera la isoforma *FLM-β*, la cual forma un complejo junto con *SVP* para inhibir la transición a la floración, mientras que en condiciones de temperatura elevada (27°C), se genera la isoforma *FLM-δ* que igualmente puede interactuar con *SVP*, pero este complejo no es funcional de forma que no puede reprimir a sus genes blanco (Lee et al. 2013; Posé et al. 2013). Estas dos isoformas, *FLM-β* y *FLM-δ*, difieren en la inclusión del segundo o tercer exón, respectivamente, que codifican para una parte del dominio Intermedio (I) de los MIKCC, el cual facilita la interacción proteína-

proteína (Lee et al. 2013; Posé et al. 2013). Aunque inicialmente se pensaba que *FLM- $\delta$*  al unirse a SVP podría funcionar como una forma dominante negativa de la proteína, un estudio de Capovilla et al. (2017) demostró que el fenotipo de floración temprana en temperatura elevada con respecto a la temperatura baja se podía explicar por la reducción de la abundancia de *FLM- $\beta$*  a 27 °C y la degradación de SVP. Mediante una aproximación utilizando la tecnología de CRISPR/Cas9 se eliminaron los exones correspondientes a cada una de estas dos isoformas de *FLM*. Al producirse solamente la isoforma de *FLM- $\beta$*  se observó el fenotipo de floración tardía esperado, sin embargo, cuando solo se producía *FLM- $\delta$*  se observó un fenotipo de floración temprana, pero no más temprana que del mutante de pérdida de función *flm-3*, lo cual sería lo esperado si en efecto la isoforma *FLM- $\delta$*  funcionará como dominante negativa (Capovilla et al. 2017).

*MADS AFFECTING FLOWERING 2 (MAF2)*, al igual que *FLM* presenta un proceso de *splicing* alternativo mediado por la temperatura. A temperaturas bajas (4–16°C) se produce preponderantemente la isoforma *MAF2var1*, la cual se traduce en la proteína funcional (Rosloski et al. 2013). Bajo este rango de temperatura, *MAF2var1* se une a SVP en un complejo represor de genes que inducen la floración, de forma que plantas *35S::MAF2var1* presentan un fenotipo de floración tardía comparadas con las plantas silvestres (Airoldi, McKay, y Davies 2015). Por otra parte, a temperatura elevada (27°C) se produce principalmente la variante *MAF2var2*. Esta variante presenta la retención del tercer intrón que genera un codón de término prematuro (CTP), y la predicción de la proteína traducida a partir de este transcrito sugiere que tendría el dominio MADS, pero no el resto de la proteína

(Rosloski et al. 2013; Airoidi, McKay, y Davies 2015). La sobreexpresión de *MAF2var2* genera plantas que florecen al mismo tiempo que las plantas silvestres, por lo que al parecer esta proteína truncada afecta la función de *MAF2var1* (Airoidi, McKay, y Davies 2015). Otra de las variantes que se han podido estudiar es la variante *MAF2var5*, la cual no presenta el dominio terminal C al introducir un CTP como parte de la retención del sexto intrón. Esta variante es capaz de unirse a SVP pero genera un complejo no funcional, de forma que las plantas *35S::MAF2var5* florecen más tempranamente que las plantas silvestres. Sin embargo, el nivel de acumulación de esta variante en todas las temperaturas probadas es bajo, por lo cual serán necesarios más estudios para determinar su relevancia (Airoidi, McKay, y Davies 2015).

Además de la posibilidad de que el *splicing* alternativo produzca diferentes isoformas de proteínas, existe también la posibilidad de que estos transcritos alternativos se mantengan como mensajeros no codificantes que a su vez pueden presentar diversas funciones regulatorias (Hubé y Francastel, 2018). Los RNAs circulares (circRNAs) son moléculas de RNA altamente estables que se generan mediante una forma de *splicing* alternativo no canónico llamado *back-splicing* (Meng et al. 2017). Estos circRNAs se han identificado en todos los grupos eucariontes y sus funciones específicas continúan siendo objeto de estudio (Wang et al. 2014). En cuanto a plantas se refiere, un estudio genómico demostró la abundancia de circRNAs en arroz (*Oryza sativa*) y Arabidopsis, así como las características que compartían y los diferenciaban de los presentes en animales (Ye et al. 2015). Conn et al. (2017) reportaron el primer fenotipo relacionado con un circRNA en plantas, al demostrar que un circRNA derivado del sexto intrón de *SEPALLATA3* (*SEP3*), un

gen MADS-box involucrado en el desarrollo de órganos florales, promovía el incremento de la abundancia de la variante de *splicing* *SEP3.3*, la cual no incluye el sexto exón y esto a su vez causa un fenotipo floral con menos estambres y un mayor número de pétalos (Conn et al. 2017). Al intentar elucidar el mecanismo detrás de este fenotipo, se descubrió que este circRNA podía unirse directamente al DNA genómico de *SEP3* y formar un asa-R (*R-loop*). Los autores hipotetizan que la formación de este bucle-R promueve una menor tasa de elongación transcripcional, lo cual a su vez puede promover la biogénesis de la variante *SEP3.3* (Conn et al. 2017). Estos resultados abren la posibilidad de que este mecanismo de regulación de *splicing* por bucles R mediado por circRNAs sea usado comúnmente para regular la expresión de una variante de *splicing* específica bajo ciertas condiciones ambientales y/o de desarrollo.

### 1.3.3. Regulación postranscripcional y procesamiento del mRNA

Los mecanismos de procesamiento del RNA son importantes para la regulación de algunos genes involucrados en el proceso de la transición a la floración. Uno de los mecanismos mejor estudiados involucrados en el procesamiento del RNA es el llamado *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), el cual en un inicio se pensaba que solamente funcionaba para degradar transcritos que pudieran traducirse en proteínas truncadas y que a su vez generarían un efecto negativo. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que además funciona como un mecanismo para controlar la abundancia de algunos transcritos bajo ciertas condiciones específicas (Kalyna et al. 2012; Drechsel et al. 2013; Shaul 2015). De hecho, el proceso de NMD modula los niveles de los transcritos de *FLM* dependiendo de la

temperatura. A 27°C la proteína de SVP es degradada, sin embargo, en esta condición la abundancia de los transcritos de *FLM* también se reduce mediante mecanismos asociados a la vía de NMD, lo cual resulta en una pérdida neta del complejo represor SVP-FLM- $\beta$  y por lo tanto en la inducción de la floración (Sureshkumar et al. 2016).

Otro mensajero que es regulado postranscripcionalmente es el de *SOC1*. Se tiene evidencia de que tanto el transcrito canónico de *SOC1*, así como transcritos con un CTP producidos a partir de su mismo locus son regulados por EARLY FLOWERING9 (ELF9), una proteína de unión a RNA, así como también por componentes clave de la vía de NMD, como Up-Frameshift protein1 (UPF1) y UPF3 (Song et al. 2009). ELF9 no es un componente *per se* del proceso de NMD, sin embargo, los autores proponen que puede funcionar para dar especificidad al complejo funcional de NMD. UPF1 y UPF3 se encargan de la activación de la vía de NMD y del transporte de transcritos del núcleo al citoplasma y viceversa, respectivamente (Dai, Li, y An 2016), y se ha demostrado que mutantes de estos genes poseen un fenotipo de floración tardía en condiciones de DL (Nasim, Fahim, y Ahn 2017). Utilizando métodos de análisis con RNA-seq, se encontró que por una parte los niveles de transcritos de *FLC* estaban aumentados en los mutantes *upf*, mientras que los niveles de mRNA de *SOC1* y *FT* se encontraban disminuidos, lo cual era consistente con el fenotipo de floración tardía mediado por *FLC* (Nasim, Fahim, y Ahn 2017). Sin embargo, en los mutantes *upf* no se encontraron transcritos alternativos de *FLC* que pudieran ser blancos directos de NMD, por lo que los autores dedujeron que *FLC* no era un blanco directo de esta vía. Lo que sí se encontró es que los mutantes de *upf* tenían niveles aumentados de los mRNAs de *MAF3*.

MAF3 se ha descrito como un regulador positivo de *FLC* (Gu et al. 2013) y debido a esto, los autores sugieren un mecanismo en el cual la vía de NMD regula directamente a *MAF3* y este a su vez regula positivamente a *FLC* (Nasim, Fahim, y Ahn, 2017).

El proceso de *splicing* alternativo puede generar transcritos que poseen características que los convierten en blancos de NMD, como pueden ser CTPs, por lo que son degradados. Sin embargo, en distintos organismos incluida *Arabidopsis*, se ha demostrado que algunos de estos transcritos que poseen características típicas de blancos de NMD, no son degradados por este mecanismo (Kalyna et al. 2012). Se ha propuesto que algunos de estos transcritos han logrado “secuestrar” la maquinaria de NMD para regular su abundancia (Hillman, Green, y Brenner, 2004) en un proceso denominado *splicing* alternativo acoplado a NMD (SA-NMD) (McGlinchy y Smith, 2008). Específicamente en plantas, hay evidencia de que el proceso de SA-NMD sirve como un mecanismo para regular un número específico de transcritos bajo diferentes condiciones de crecimiento, así como en estrés (Kalyna et al. 2012; Drechsel et al. 2013; Sureshkumar et al. 2016).

#### **1.3.4. Regulación postraduccional e interacciones proteína-proteína**

En cuanto a la regulación postraduccional de los factores de transcripción con dominio MADS se refiere, se tiene evidencia de que estos se unen a una secuencia consenso del DNA conocida como la caja CArG (CC[A/T]<sub>6</sub>GG), y pueden hacerlo formando homodímeros, heterodímeros, tetrámeros, así como también complejos proteicos más complejos (Lai et al. 2019). Esta secuencia consenso se encuentra representada 340,000 veces dentro del genoma de *Arabidopsis* por lo cual se hipotetiza que los factores de transcripción con

dominio MADS pueden regular potencialmente hasta un 30% de todos los genes de *Arabidopsis* (Folter y Angenent, 2006). Se sabe también que los factores de transcripción con dominio MADS pueden unirse entre ellos o reclutar proteínas de otras familias como activadores o represores de la transcripción, así como también factores remodeladores de la cromatina, lo cual señala la gran diversidad funcional que pueden llegar a tener estos factores de transcripción en diversos contextos y momentos del desarrollo (Smaczniak et al. 2012). A partir del modelo del cuarteto floral se hipotetizó que un complejo tetramérico de proteínas MADS compuesto de dos dímeros se une a dos cajas CArG a cierta distancia, lo cual genera un asa de DNA entre los dos sitios de unión. Recientemente se probó la validez de esta hipótesis *in vivo* al demostrar que dos factores de transcripción con dominio MADS, STK y SEPALLATA3 (SEP3), regulan directamente la expresión de *VERDANDI* (*VDD*), un gen importante para la determinación de la identidad celular del gametofito femenino (Mendes et al. 2013). El tetrámero constituido por 2 dímeros de STK-SEP3 inducen la formación de un asa del DNA dentro del promotor de *VDD* lo que es esencial para su activación.

Para poder llevar a cabo su actividad transcripcional, dentro del dominio MADS se encuentra una señal de localización nuclear en el motivo KR[K/R]X<sub>10</sub>KK<sub>3-5</sub> (Lai et al. 2019). Además, se ha demostrado que la expresión espaciotemporal de las proteínas con dominio MADS está regulada en cierta medida al nivel postraducciona. Se tiene evidencia de que la prolil cis/trans-isomerización dependiente de fosforilación de SOC1 y AGL24 afecta la estabilidad de AGL24 en el núcleo (Wang et al. 2010). Igualmente se ha demostrado que la translocación al núcleo de algunas proteínas con dominio MADS está regulada mediante la

dimerización con otras proteínas. Lee et al. (2008) demostraron que al expresar solamente a SOC1 de forma transitoria en protoplastos este se localizaba en el citoplasma, pero al expresarlo simultáneamente con AGL24, ambos se translocaban al núcleo. Curiosamente, la translocación al núcleo y la unión con AGL24 están mediados por los dominios MADS e Intermedio (Lee et al. 2008).

## 2. Antecedentes

*AGL19* es parte del clado filogenético *TM3/SOC1*, el cual incluye a *SOC1*, *AGL42*, *AGL71*, *AGL72* y *XAL2*, los cuales están implicados en la regulación del tiempo de floración (Dorca-Fornell et al. 2011; Gramzow y Theißen, 2015; Pérez-Ruiz et al. 2015). Mediante ensayos de floración utilizando dos alelos mutantes de *AGL19* por inserciones de T-DNA en el primer intrón (*agl19-1* y *agl19-2*), se observó que estos mutantes presentaban un fenotipo de floración tardía cuando las plantas eran vernalizadas por 6 semanas seguido de un periodo de crecimiento en DC, indicando que *AGL19* es necesario para promover la floración en esta condición. Este fenotipo de floración tardía no se observó en plantas vernalizadas que posteriormente se crecieron en DL (Figura 5A). En el mismo estudio se demostró que la actividad de *AGL19* es independiente de la represión de *FLC* (Schönrock et al. 2006). Sin embargo, hasta el momento no se conoce qué genes son regulados por *AGL19* durante el proceso de vernalización.

Al igual que *FLC*, *AGL19* es regulado mediante mecanismos epigenéticos, específicamente mediante un complejo de proteínas PcG. Sin embargo, en este caso durante el desarrollo vegetativo hay una mayor acumulación de H3K27me3 sobre el locus de *AGL19*, particularmente en el primer intrón, mientras que en las plantas vernalizadas los niveles de enriquecimiento de H3K27me3 se reducen drásticamente y los niveles de expresión de *AGL19* aumentan (Figura 5B). Cabe mencionarse que los niveles de *AGL19* se incrementan con la edad en plantas que no han sido vernalizadas (Figura 5D) (Schönrock et al. 2006).

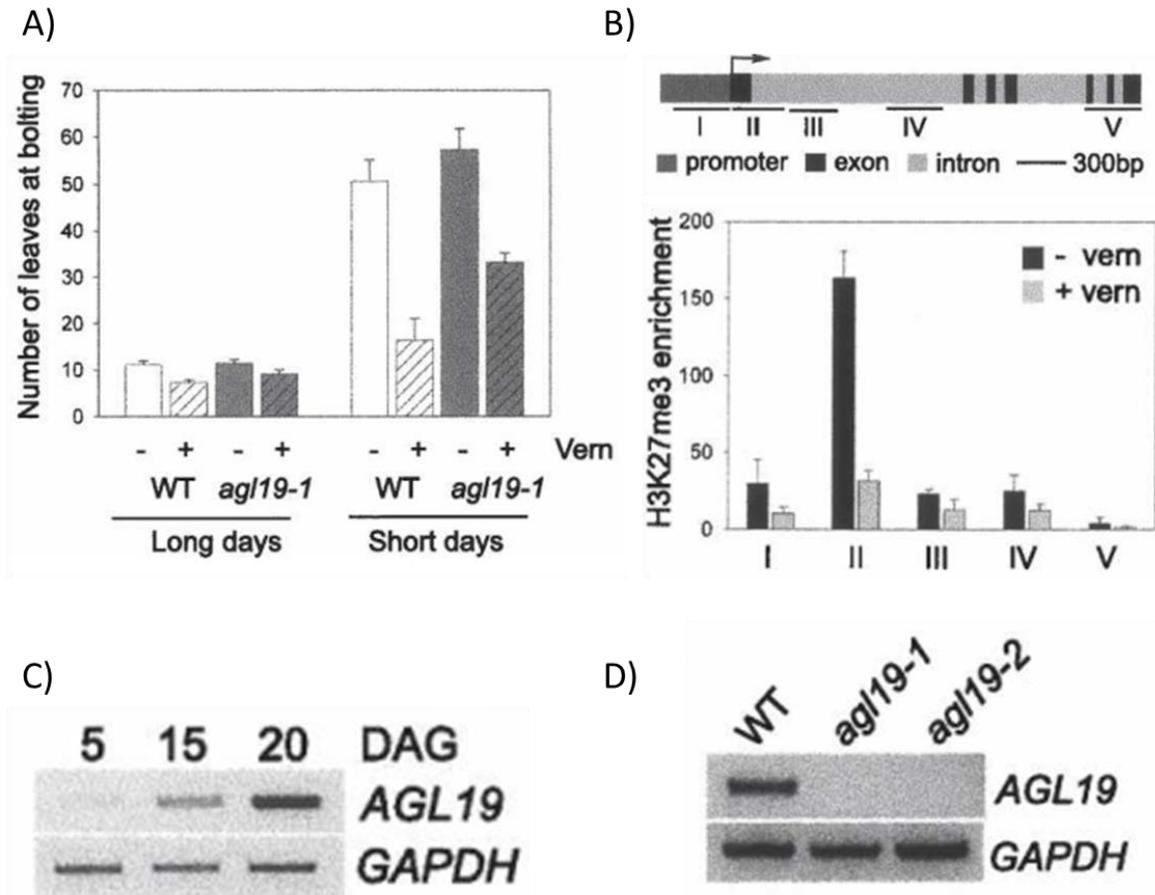


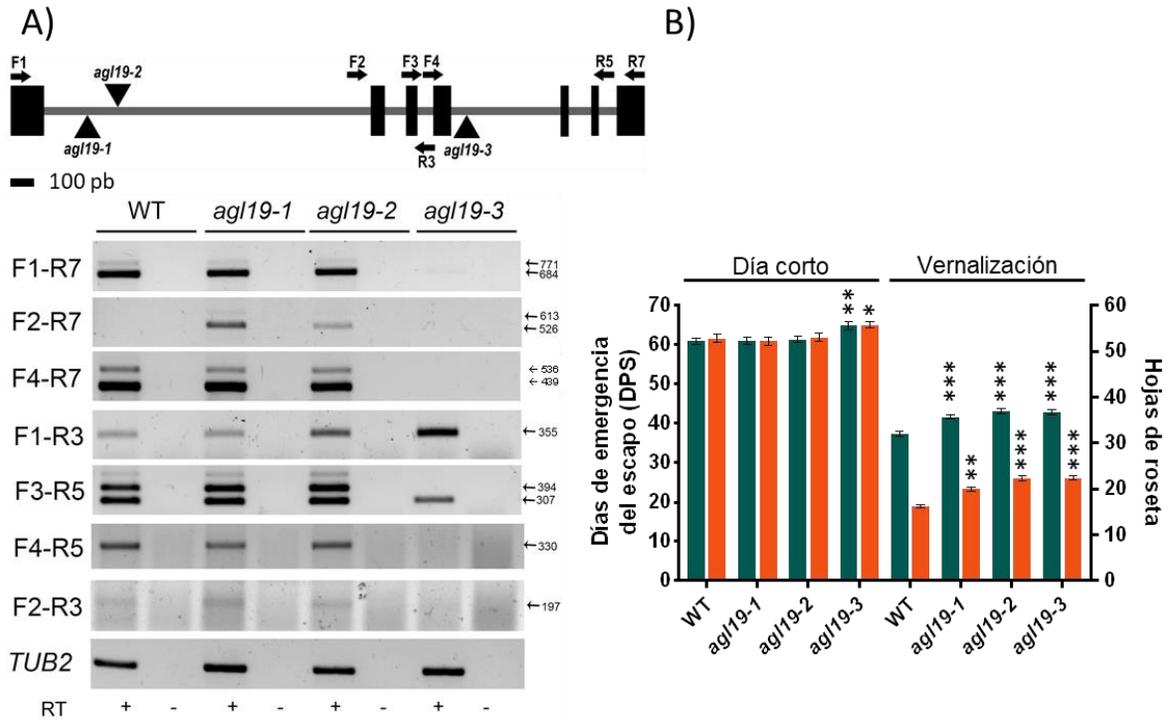
Figura 5. *AGL19* es un promotor de la floración en respuesta a la floración y es regulado epigenéticamente mediante la marca represiva de H3K27me3. A) Mutantes de *agl19* muestran un fenotipo de floración tardía después de un tratamiento de vernalización de 6 semanas seguido de un periodo de crecimiento en DC. En DL no se observa este fenotipo. B) Antes de la vernalización *AGL19* se encuentra reprimido por una alta acumulación de H3K27me3 en la región del primer exón y región 5' del primer intrón y esta acumulación se reduce considerablemente después de la vernalización. Arriba: esquema genómico de *AGL19* con los fragmentos de ChIP analizados. Abajo: Gráfica de enriquecimiento de H3K27me3 en los diferentes fragmentos de *AGL19* analizados. Experimento de ChIP realizado con plántulas WT de 10 dps crecidas en DC con y sin un tratamiento de vernalización de 6 semanas. C) La acumulación de *AGL19* aumenta conforme al desarrollo de la planta aún sin un tratamiento de vernalización. RT-PCRs de plantas crecidas en DC. La edad se midió como días después de la germinación (*days after germination* (DAG)). D) Los alelos mutantes por inserción de T-DNA *agl19-1* y *-2* fueron reportados originalmente como mutantes nulos. RT-PCRs de plantas de 40 días crecidas en DL (Schönrock et al. 2006).

Los alelos mutantes utilizados por Schönrock *et al.* (2006), corresponden a inserciones de T-DNA en el primer intrón (*agl19-1* y *agl19-2*) y fueron considerados como

alelos de expresión nula (Figura 5D y 6A). Sin embargo, en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas (Instituto de Ecología, UNAM), se observó acumulación del transcrito completo de *AGL19* en dichas líneas mutantes y no se encontró acumulación del mensajero completo en un tercer alelo mutante, aquí nombrado *agl19-3*, (aislado y caracterizado en el laboratorio). Este último, presenta una inserción de T-DNA en el cuarto intrón (Figura 6A).

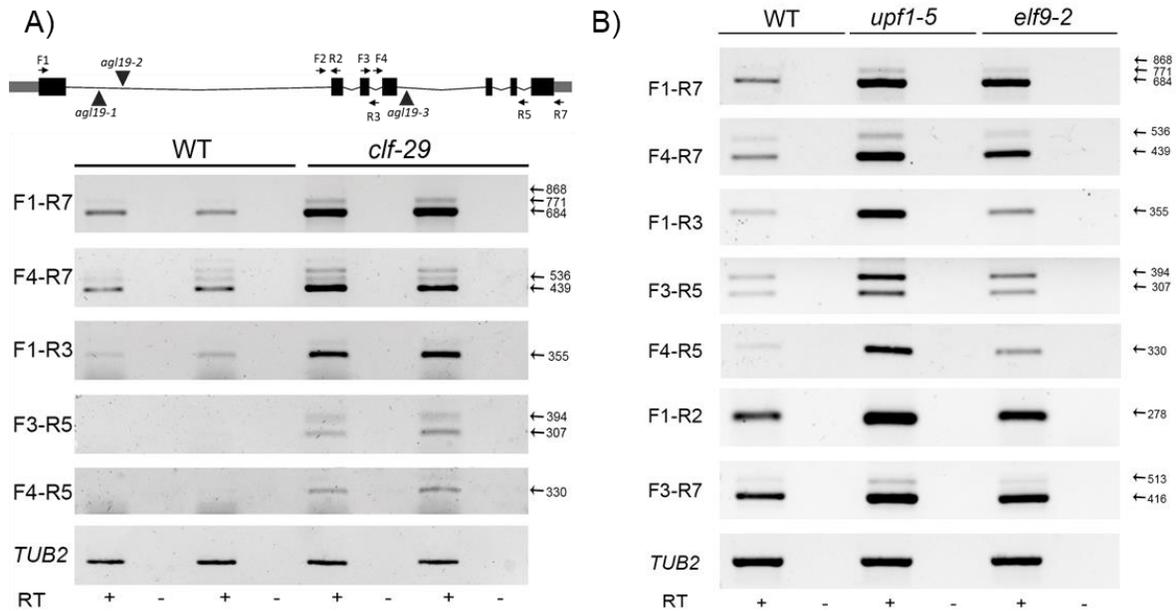
Mediante RT-PCR se hizo un análisis comparativo entre los tres alelos en donde se comparó la acumulación de diferentes fragmentos que pudieran incluir algún intrón, ya que se había observado un fragmento de mayor tamaño al transcrito canónico esperado (Figura 6A amplificación F1-R7). Se encontró que efectivamente existían transcritos producto de un proceso de *splicing* alternativo que incluyen preferencialmente los intrones 3 y/o 6 (Figura 6A; datos de Cruz-Sanchez sin publicar; Yustis, 2018, Tesis de Licenciatura, UNAM).

De forma interesante, *agl19-3* presenta un fenotipo de floración tardía similar al de *agl19-1* y *agl19-2* bajo las mismas condiciones de vernalización que utilizaron en el artículo de Schönrock *et al.* (2006) (Figura 6B).



**Figura 6. Acumulación del transcrito canónico de *AGL19* y sus transcritos alternativos en tres mutantes alélicas por inserción de T-DNA y sus respectivos fenotipos en el tiempo de floración.** A) Mientras que las plantas silvestres (WT) y *agl19-1* y *agl19-2* presentan acumulación del transcrito canónico de *AGL19* (F1-R7, 684 pb) y otros de mayor tamaño (771 pb aprox), *agl19-3*, no se observa acumulación de estos transcritos. RT-PCRs de plantas de 40 días post-siembra (dps) en DL, donde se acumula fuertemente los transcritos de *AGL19*. B) Tiempo de floración de los 3 alelos mutantes de *agl19* donde se muestra un fenotipo de floración tardía similar en plantas vernalizadas y crecidas posteriormente en DC. Además se encontró que *agl19-3* también tiene un fenotipo sutil pero significativo de floración tardía en fotoperiodo de DC. Los datos representan la media de los DPS hasta la emergencia del escapo (escapo de 1 cm) (barras verdes) y número de hojas de roseta contadas al momento de la emergencia del escapo (barras naranjas). Los datos corresponden a la media y el error estándar. Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos con una prueba de ANOVA de 2 vías (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ );  $n = 23$  en cada caso (datos de Cruz-Sanchez sin publicar).

Por otra parte, se demostró que tanto *AGL19* como sus transcritos alternativos eran regulados por CLF, un componente del complejo represor PRC2 que regula a *AGL19* (Figura 7A), así como también por proteínas involucradas en el procesamiento del mRNA y en la vía de NMD (Figura 7B).



**Figura 7. Los transcritos alternativos de *AGL19* se producen de forma natural y son regulados por CLF, así como también por proteínas de la vía NMD.** A) RT-PCR de la parte aérea de plantas WT y *clf-29* de 10 días crecidas en DL y esquema de la estructura genómica de *AGL19* con los oligonucleótidos utilizados. Se muestran resultados para 2 réplicas biológicas independientes. *AGL19* y sus transcritos alternativos se acumulan en mayor medida en mutantes de la unidad catalítica de un complejo PRC2. B) RT-PCR de la parte aérea de plantas WT, *upf1-5* y *elf9-2* de 14 días crecidas en DL. En mutantes de componentes de la vía de procesamiento de RNA NMD existe mayor acumulación de *AGL19* y sus transcritos alternativos (Yustis, 2018, Tesis de Licenciatura, UNAM).

Puesto que *agl19-3*, el cual no acumula el mensajero completo de *AGL19*, tiene un fenotipo similar a los otros dos alelos mutantes, nos planteamos dos posibles explicaciones: la primera es que los transcritos alternativos acumulados en *agl19-1* y *agl19-2* se traduzcan, lo cual podría generar proteínas truncadas que actuaran como dominantes negativos. Una segunda posibilidad es que estos transcritos estén actuando como RNAs no codificantes y de esta forma estén reprimiendo la acumulación de genes diferentes a *AGL19* que sean necesarios para inducir la floración. De esta forma, los mutantes *agl19-1* y *agl19-2* generarían el mismo fenotipo que el mutante *agl19-3* de pérdida de función. Para empezar a entender el posible papel de los transcritos alternativos de *AGL19* que presentan la

retención de los intrones 3 y/o 6, en este trabajo nos planteamos conocer su acumulación en respuesta a la vernalización y el posible efecto que podrían tener las inserciones de T-DNA en su acumulación.

Por otra parte, estamos interesados en conocer genes que sean regulados por AGL19 y que estén implicados en la respuesta a la vernalización. Por lo que con anterioridad se realizó un microarreglo donde se compararon plantas WT vernalizadas seguido de un periodo de crecimiento en DC, contra plantas WT crecidas en DC y plantas *agl19-3* vernalizadas contra plantas WT vernalizadas y en este trabajo se llevará a cabo su análisis y confirmación.

Con base en todo lo anterior sugerimos la hipótesis y objetivos que a continuación se mencionan.

### 3. Hipótesis

A partir del locus de *AGL19* se genera un transcrito que da lugar a una proteína funcional y a transcritos alternativos que participan en la regulación de la transición a la floración en respuesta a la vernalización.

### 4. Objetivo

Determinar el papel de *AGL19* en la transición a la floración en respuesta a la vernalización y el posible efecto de sus transcritos alternativos en su regulación.

#### 4.1. Objetivos Particulares

- Identificar genes que sean regulados por *AGL19* durante la transición a la floración por vernalización.
- Aislar los transcritos alternativos de *AGL19* que contienen los intrones 3 y/o 6
- Determinar el efecto de las inserciones de T-DNA de los tres alelos mutantes de *AGL19* (*agl19-1*, *agl19-2* y *agl19-3*) en la deposición de la marca de represión H3K27me3 en la región 5' de este gen.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1. Plantas y condiciones de crecimiento

Las plantas silvestres (WT) y mutantes (*agl19-1*, *agl19-2* y *agl19-3*) de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en este trabajo son del ecotipo Columbia (Col-0). Para las plantas crecidas en caja Petri, las semillas se esterilizaron utilizando 0.5 mL de una solución de cloro al 60% y Tween al 0.005%, agitándolas durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se realizaron de 4 - 5 lavados con 0.5 mL de agua estéril durante aproximadamente 2 minutos y finalmente se les agregó 0.5 mL de agarosa al 0.3%. Las semillas se estratificaron a una temperatura de 4°C durante 3 días antes de la siembra, esto para sincronizar su germinación y desarrollo. Las semillas se sembraron en cajas Petri cuadradas con 80 mL de medio de crecimiento Murashige-Skoog (MS) 0.2X, sacarosa 1.0% y agar 1.0%.

Para los ensayos de vernalización las semillas se esterilizaron y se dejaron 24 h a temperatura ambiente antes de la siembra. Se sembraron en cajas Petri con 100 mL de medio de crecimiento Murashige-Skoog (MS) 0.2X, sacarosa 1.0% y agar 1.0% y se colocaron en oscuridad a 4°C durante 8 semanas. Posteriormente se pasaron a una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de día corto (DC; 8 h de luz) y 23 °C durante 15 días. Las plantas control, se esterilizaron y estratificaron por 3 días y se crecieron simultáneamente que las vernalizadas en la misma cámara de crecimiento por 15 días.

Las plantas silvestres y los mutantes *agl19-1*, -2 y -3 utilizados para el ensayo de ChIP, se crecieron directamente en sustrato en un cuarto de crecimiento a 23 °C en día largo (DL; 16 h de luz) durante 40 días post-siembra (dps).

### 5.2. *Extracción y cuantificación de RNA*

El material vegetal utilizado para extraer RNA se obtuvo a partir de la parte aérea de plantas en diferentes condiciones de crecimiento. Para la extracción de RNA se utilizó el kit DirectZol RNA MiniPrep (Zymo Research), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El RNA se cuantificó utilizando 1 µl de cada muestra de RNA en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). Se realizó la electroforesis del RNA total en un gel de agarosa al 1.2% que contiene formaldehído al 3% y buffer MOPS 1X, de esta forma se comprobó la integridad de los RNAs y se calibraron para comprobar que hubiera la misma cantidad de cada muestra antes de realizar la síntesis de cDNA.

### 5.3. *Análisis del microarreglo*

Se realizó el análisis de datos de microarreglos previamente realizados en el laboratorio donde se realizaron dos comparaciones: plantas WT vernalizadas por 8 semanas seguido de un periodo de crecimiento de 15 días en DC contra plantas WT crecidas 15 días en DC, y plantas WT vernalizadas contra plantas *agl19-3* vernalizadas. Para el análisis del microarreglo se eligió primeramente a aquellos genes que tuvieran un Z-score >1 en las listas de genes inducidos y reprimidos en las diferentes condiciones. Para encontrar genes que estuvieran regulados por AGL19, negativa o positivamente, después de un tratamiento de vernalización,

se hicieron comparaciones cruzadas de genes cuya expresión cambiaba en plantas WT vernalizadas con respecto a plantas WT en DC (AthV3\_04\_37) con las listas de genes cuya expresión se alteraba en el mutante *agl19-3* en condiciones de vernalización con respecto a plantas WT en la misma condición (AthV3\_04\_35) (Tabla 2). Para este análisis se utilizó el software en línea Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Posteriormente se eligieron aquellos genes que estuvieran inducidos en plantas silvestres vernalizadas y además reprimidos en plantas *agl19-3* en condiciones de vernalización, así como genes que fueran reprimidos por vernalización en plantas silvestres e inducidos en *agl19-3*. Posteriormente para elegir genes con una expresión diferencial se realizó una transformación de Z-score a *p-value* para poder hacer un corte de la lista de genes con un *p-value* significativo ( $p\text{-value} < 0.05$ ). Esta transformación se realizó tomando todos los valores de Z-score de las listas de genes analizados y utilizando la función DISTR.NORM.N del programa Excel, la cual devuelve la función de distribución normal estándar acumulativa. A partir de los valores obtenidos se seleccionó a aquellos genes que tuvieran un *p-value*  $< 0.05$  en ambos microarreglos analizados (Tabla 2).

**Tabla 2. Hibridaciones utilizadas para la realización del microarreglo.** Los genes inducidos y reprimidos se expresan en función de las condiciones marcadas con Alexa647 (Cy5).

| Chip        | Alexa555 (Cy3)                | Alexa647 (Cy5)                            |
|-------------|-------------------------------|---|
| AthV3_04_35 | WT vernalización + 15 días DC | <i>agl19-3</i> vernalización + 15 días DC |
| AthV3_04_37 | WT vernalización + 15 días DC | WT 15 días DC                             |

#### 5.4. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg RNA, utilizando un oligo (dT) (GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT TTT) y la enzima reversotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para la realización de RT-qPCR se utilizó el sistema SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Por cada RT-qPCR se utilizaron 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una. La reacción se realizó en un volumen de 10 µL. Para analizar los niveles de expresión de los diferentes genes se utilizaron pares de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 3). La eficiencia de amplificación de todos los genes se analizó mediante el algoritmo de Real-Time PCR Miner (Zhao y Fernald, 2005). Como genes normalizadores se utilizaron *PDF2* (AT1G13320), *RNAH* (AT1G58050) y *UPL7* (AT3G53090). Para determinar los genes normalizadores más adecuados para el análisis y la estabilidad de cada uno de estos se utilizó el algoritmo de geNorm (Vandesompele et al. 2002). Finalmente, para determinar las diferencias de expresión entre los diferentes genotipos y tratamientos se utilizó el análisis de cuantificación relativa ( $\Delta\Delta CT$ ) con el software qBase+ (v. 3.2, Biogazelle), utilizando los valores de CT provenientes del análisis mediante el algoritmo de Real-Time PCR Miner.

Tabla 3. Pares de oligonucleótidos utilizados en experimentos de RT-qPCR.

| Nombre del Gen           | Secuencia (5'→3')                  |
|--------------------------|------------------------------------|
| <i>PDF2</i>              | TAA CGT GGC CAA AAT GAT GC         |
|                          | GTT CTC CAC AAC CGC TTG GT         |
| <i>RNAH</i>              | CCA TTC TAC TTT TTG GCG GCT        |
|                          | TCA ATG GTA ACT GAT CCA CTC TGA TG |
| <i>UPL7</i>              | TTC AAA TAC TTG CAG CCA ACC TT     |
|                          | CCC AAA GAG AGG TAT CAC AAG AGA CT |
| <i>AGL19 3'</i>          | CCA AGA AGT ACC AAT TAC TCC GTG    |
|                          | CCC ATT CCA AGC CAC TTC TC         |
| Intrón 3 de <i>AGL19</i> | GAG ACG AAA CAT CTG GAT TG         |
|                          | CGT TTC TCA TAA GAA ATT TTG AG     |
| Intrón 6 de <i>AGL19</i> | GAA ATT GAG AAG TTG AAG GCA GAG    |
|                          | CTC TTC TAC TCA GCA ACA TAT TA     |
| <i>FLC</i>               | TAG AGC CAA GAA GAC CGA ACT C      |

|              |                                    |
|--------------|------------------------------------|
|              | CTC CCA CAT GAT GATT ATT CTC CA    |
| <i>AGL24</i> | GAG GCT TTG GAG ACA GAG TCG GTG A  |
|              | AGA TGG AAG CCC AAG CTT CAG GGA A  |
| <i>SOC1</i>  | AGC TGC AGA AAA CGA GAA GCT CTC G  |
|              | GGG CTAC TCT CTT CAT CAC CTC TTC C |
| <i>XAL2</i>  | GAT AAT TCA CAG CAA TCG AAG G      |
|              | GGT TCT CCA ATT GTT GTA ACT C      |
| <i>AGL21</i> | CAA GAA GGC TTA TAT GGC AAA C      |
|              | CTC TCT GTT ATT GCT TTG CTC T      |
| <i>LFY</i>   | ATC GCT TGT CGT CAT GGC TG         |
|              | GCA ACC GCA TTG TTC CGC TC         |
| <i>AP1</i>   | CAT GGG TGG TCT GTA TCA AGA AGA T  |
|              | CAT GCG GCG AAG CAG CCA AGG TT     |
| <i>RHA1A</i> | AAC TAA TTG GTT TAA TCT ATG TC     |
|              | GTG TTG TTT TTG TAT AAA GAT ATA T  |

|                  |                               |
|------------------|-------------------------------|
| <b>VGT1</b>      | GCT AAA GGA GCT GTT AGG AG    |
|                  | GAA AGT GGA GCT AAG ATG AGT A |
| <b>OTP43</b>     | TGG TTG AGA GAG GGT TTA TAC   |
|                  | GCT ACC AGA TTT ACT CTG CAA   |
| <b>SINE2</b>     | TTG GAG ATC AGA TTC AAT GTT C |
|                  | GTT GGT CCT AGA GCA CAC AG    |
| <b>AT1G19130</b> | TTA CTG TAG TGG AAC TCT ACG   |
|                  | CTA GCC TCA GCT TTA AGC AGA   |

### 5.5. Obtención, clonación y secuenciación de los transcritos alternativos de *AGL19*

Para confirmar las secuencias de los intrones incluidos en los transcritos alternativos, se amplificó el cDNA completo de *AGL19* de plantas silvestres vernalizadas con un par de oligonucleótidos que abarcan desde el ATG hasta el codón de término (Tabla 4). Se tomó toda la reacción de PCR y se clonó utilizando el sistema CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Una vez obtenida la reacción de ligación con el vector pJET1.2/blunt se transformaron células competentes de *Escherichia coli* de la cepa DH5 $\alpha$ . La transformación se realizó tomando 10  $\mu$ l de la reacción de ligación a los cuales se le agregaron 40  $\mu$ l de un buffer de transformación (KCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 60 mM, PEG 3%) y 50  $\mu$ l de células quimio-competentes. Después se les aplicó un

choque térmico de 5 min a temperatura ambiente, se pusieron en hielo y a la reacción se le agregó 900 µl de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 hora en agitación. Las células se crecieron en placas de medio LB sólido adicionado con ampicilina (100 µg/mL). Para confirmar cuáles transcritos se habían clonado se tomaron 50 colonias al azar y se realizaron Minipreps de acuerdo con el método descrito por Maniatis, Fritsch y Sambrook (1982), para comprobar por PCR. Con base en los tamaños de los fragmentos obtenidos, se podía saber cuáles contenían los transcritos alternativos. Una vez que se identificaron las clonas se purificó nuevamente el DNA, ahora con el kit ZR Plasmid Miniprep – Classic (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se enviaron para su secuenciación al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología, UNAM. Una vez recibidas las secuencias se realizaron alineamientos para comprobar primeramente que estas clonaciones no presentaran mutaciones puntuales y segundo, comprobar las secuencias incluidas en los transcritos alternativos de *AGL19*.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la clonación del cDNA de *AGL19*.**

| Oligonucleótido <i>forward</i> (5'→3') | Oligonucleótido <i>reverse</i> (5'→3') |
|--|--|
| ATG GTG AGG GGC AAA ACG G              | TTA ATT TTG AGG AGG GAA TTT TTT G      |

Para comprobar que en los alelos mutantes *agl19-1* y *-2* no existieran mutaciones o alguna otra alteración del transcrito codificante, se amplificó por RT-PCR el cDNA de hojas de plantas *agl19-1* y *-2* crecidas en tierra por 40 dps con los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 5, los cuales amplifican desde el ATG de *AGL19* hasta la región 5' del último exón.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1% y se aisló el fragmento amplificado que contenía el marco de lectura completo de *AGL19* en cada uno de los mutantes. Para purificar los productos de PCR se utilizó el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se enviaron a secuenciar. Para comprobar que no hubiera mutaciones puntuales o alguna otra alteración de las secuencias se realizaron alineamientos con el cDNA de *AGL19*.

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el cDNA de *AGL19* en los mutantes *agl19-1* y *agl19-2*.**

| Oligonucleótido <i>forward</i> (5'→3') | Oligonucleótido <i>reverse</i> (5'→3') |
|--|--|
| GTG AGG GGC AAA ACG GAG ATG            | ACG TTG ATT GTG ATG ATG C              |

### 5.6. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó con el método publicado por Desvoyes et al. (2018) y las modificaciones descritas por Vega-León (2018) (Tesis de Maestría, UNAM).

La parte aérea de las plantas silvestres y mutantes (*agl19-1*, *agl19-2* y *agl19-3*) de 40 días se fijaron en grupos de 5 plantas por réplica, con una solución de PBS 1X y formaldehído al 1%. Las muestras se colocaron en una cámara de vacío durante 2 mins, seguido de 2 mins sin vacío; este procedimiento se repitió 3 veces. Para detener la reacción de fijación se utilizó glicina 0.1M y se incubaron las muestras 2 mins en vacío seguido de 4 mins sin vacío. Para finalizar el tejido se lavó con agua bidestilada 4 veces y se congeló utilizando nitrógeno líquido. Para la extracción de proteínas se trituró aproximadamente 1g de material aún

congelado, el cual se resuspendió en 20 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 10 mM, pH 8, sacarosa 0.25 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM) e inhibidor de proteasas casero 1X, el cual contiene: aprotinina 1X, leupeptina 1X, AEBSF 1X, E64 1X, fenotrolina 1X, pepstatina A 1X y bestatina 1X. Las muestras se incubaron en agitación a 4°C durante 1 hora. Cada muestra se filtró a través de dos mallas microcloth (Millipore) y se centrifugaron a 4°C a 3000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1X (Sigma)), posteriormente se agregó SDS a una concentración final 1% y se incubó durante 1 hora a 4°C en agitación. Finalmente, las muestras se sonicaron durante 30 segundos seguido de 30 segundos sin sonicación por 30 ciclos en hielo con un sonicador Q700 con una potencia del 20% (Fisherbrand, Fisher Scientific). Para cuantificar la cromatina extraída y verificar que la sonicación resultó en los tamaños de fragmentos deseados (entre 300 y 700 pb) se separó una alícuota de 40 µL de cromatina sonicada de cada muestra y se procedió a revertir el entrecruzamiento. Para esto se les agregó 160 µL de agua y 8 µL de NaCl 5M y se dejaron incubando a 65°C y en agitación a 1000 rpm toda la noche. Posteriormente se le agregó a las muestras 8 µL de Tris-HCl pH 6.8 y 4 µL de RNAsa A/T (Invitrogen). Se incubaron 1 hora a 37°C y 500 rpm. Después se agregó 4 µL de EDTA 0.5 M y 2 µL de proteinasa K (Invitrogen, 10 mg/mL) y se incubaron 2 horas a 37°C y 500 rpm. Finalmente se realizó una extracción con una solución de fenol cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1). Para la cuantificación del DNA se utilizó el sistema Qubit (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Para verificar el tamaño de los fragmentos sonicados se corrió el resto de las muestras en un gel de agarosa 1% y se verificó que el barrido estuviera en el rango requerido.

Para la inmunoprecipitación se tomó un volumen tal que contuviera aproximadamente 1 µg de cromatina por cada inmunoprecipitado y se diluyó 10 veces en buffer de dilución (Tris-HCl 16.7 mM pH 8, NaCl 167 mM, EDTA 1.2 mM, Triton X-100 1.1%, PMSF 1mM e inhibidor de proteasas 1X). Para el pre-aclareado de la cromatina las muestras se incubaron a 4°C en agitación durante 1 hora con 30 µL de perlas de proteína A/G PLUS-Agarosa (Santa Cruz Biotechnology) previamente lavadas con PBS 1X. Después se centrifugaron a 4°C durante 1 minuto a 1200 rpm. De cada una de las muestras se tomó un 10% del total para utilizarse posteriormente como input. Del sobrenadante se tomó 1 µg de cromatina para cada inmunoprecipitado y se dejaron precipitando toda la noche a 4°C en agitación con las cantidades respectivas para cada anticuerpo 5 µg de anti-H3K27me3 (Abcam, ab6002) y 2 µg de anti-H3 (Abcam, ab1791). Posteriormente se incubaron las muestras a 4°C durante 2 horas en agitación con 50 µL de proteína agarosa A/G plus previamente lavada (2 veces) con PBS 1X. Para la recuperación de los inmunocomplejos, se realizaron diferentes lavados consecutivos con los buffers que se indican a continuación:

1. Buffer de baja sal (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, PMSF 1mM e inhibidor de proteasas 1X)
2. Buffer de alta sal (Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 500 mM, SDS 0.1%, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1X)
3. Buffer de LiCl (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, LiCl 250 mM, Igepal CA-630 1%, desoxicolato de sodio 1%, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1X)

4. Buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de proteasas 1X)

Con cada uno de los buffers primero se realizó un lavado rápido y posteriormente otro lavado incubando las muestras a 4°C en rotación durante 5 minutos. Entre cada uno de los lavados las muestras se centrifugaron a 4°C por 2 minutos a 1200 rpm. Para la elución de los inmunocomplejos se agregó a cada una de las muestras 200 µL de buffer de elución (SDS 1%, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM) el cual fue previamente calentado a 65°C y se incubaron en agitación durante 15 minutos a 65°C. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 1000 rpm y se tomó el sobrenadante. El paso de elución se realizó 2 veces para obtener un volumen final de 400 µL. El desentrecruzamiento se realizó agregando 16 µL de NaCl 5M a las muestras y se incubaron a 65°C en agitación durante toda la noche. Para la extracción de DNA, primeramente se realizó una digestión de RNA y proteínas. Cada muestra se incubó 30 minutos a 37°C con 16 µL de Tris-HCl 1 mM pH 6.8 y 16 µg de RNAsa A/T (Invitrogen). Después se agregó a cada muestra 8 µL de EDTA 0.5 M y 2 µL de proteinasa K (Invitrogen, 10 mg/mL). Las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C y 500 rpm. Finalmente, la extracción de DNA se realizó mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (F:C:I 25:24:1) utilizando tubos "phase lock" caseros. Estos tubos permiten separar la fase orgánica mediante una grasa inerte y tomar el sobrenadante sin riesgo de contaminación de F:C:I.

Los fragmentos de DNA inmunoprecipitados se analizaron mediante qPCR. Se amplificaron una serie de fragmentos de DNA sobre la región 5' de *AGL19* donde ya se tiene reportado que la marca H3K27me<sub>3</sub> se encuentra presente, mediante el análisis de datos de

ChIP-seq (UCSC Genome Browser on Arabidopsis thaliana Feb. 2011 Thale cress Assembly (araTha1)) y lo reportado por Schönrock *et al* (2006). Con los pares de oligonucleótidos utilizados se amplificaron fragmentos de DNA en la región 5' del primer intrón del gen, posicionados río arriba (F1, F2), entre (F3) y río abajo (F4) de las inserciones de T-DNA presentes en *agl19-1* y *agl19-2* (ver esquema de la posición de los oligonucleótidos utilizados en la Figura 14A en la sección de Resultados); y todos ellos se encuentran por arriba de la inserción de *agl19-3* (Tabla 6). Para el análisis de los datos por qPCR primeramente se normalizaron los datos de H3K27me3 y de la histona H3 sin modificar contra un input (10% de la cromatina total extraída). El análisis de enriquecimiento de H3K27me3 se realizó con respecto al enriquecimiento de histona H3 sin modificar, por lo que los datos de H3K27me3 se normalizaron con respecto a los datos de la histona H3. Para este experimento se realizaron dos réplicas biológicas independientes con 6 réplicas técnicas cada una.

Tabla 6. Lista de los oligonucleótidos utilizados para el análisis de ChIP por qPCR.

| Nombre del Fragmento | Secuencia (5'→3')     | Tamaño del Fragmento (pb) |
|----------------------|-----------------------|---------------------------|
| F1                   | CTAGAAGTAAAGGATGGTGAG | 205                       |
|                      | AGGGACATACCTAGAGCTAG  |                           |
| F2                   | AGGACTGACACTAATGATAC  | 71                        |
|                      | CGTTTCATAGGTTGTAGTGC  |                           |
| F3                   | CGCTGTAGATGAGTTGATCT  | 133                       |
|                      | GCAGTAGCACTGGTGTCAAA  |                           |
| F4                   | TCTCGCCCTGCTGTAATACA  | 108                       |
|                      | GCTTCGTCTCATCCCTAGCA  |                           |

## 6. Resultados

### 6.1. Identificación de genes regulados positivamente por AGL19 después de la vernalización

Para conocer los genes que son regulados por la vernalización y que además fueran regulados por AGL19, se hizo el análisis de un microarreglo de plántulas vernalizadas por 8 semanas seguido de un periodo de crecimiento de 15 dps en DC, contra plantas silvestres y *agl19-3* crecidas en DC por 15 dps. Para esto, se tomaron primero las listas del microarreglo de genes diferencialmente expresados ( $Z$ -score  $>1$ ) para aquellos genes que estuvieran inducidos o disminuidos por vernalización en las plantas silvestres (WT) y de estos, se contrastaron con las listas de genes desregulados en las plantas *agl19-3* vernalizadas. Del total de genes analizados (16,923) se encontró que 2149 (16.9%) genes se encontraban inducidos en las plantas WT vernalizadas, mientras que estaban reprimidos en las plantas *agl19-3* vernalizadas (Figura 8), lo que indica que estos genes podrían ser regulados positivamente por AGL19 durante el proceso de vernalización. De total de 4256 genes inducidos por vernalización en plantas WT, alrededor de la mitad (2149 genes) depende de AGL19, mientras que apenas 48 genes mantienen su inducción en el mutante *agl19-3*. Esto indica que AGL19 tiene un papel muy relevante en el proceso de vernalización, muy posiblemente como un activador. Igualmente se encontró que del total de genes analizados hay 2059 (16.2%) genes inducidos por la vernalización independientemente de la presencia de AGL19 y 1954 (15.3%) genes que podrían ser regulados negativamente ya que se



Por otra parte, se buscaron aquellos genes que posiblemente actúan como represores de la floración en respuesta a vernalización, los cuales podrían ser regularlos negativamente por AGL19 para que se pueda dar esta transición. Por lo tanto, se compararon los genes reprimidos por la vernalización en plantas silvestres, pero inducidos en *agl19-3*. De esta comparación se encontraron 6 genes (Tabla 8).

**Tabla 7. Genes inducidos por vernalización y candidatos a ser regulados positivamente por AGL19.**

| Locus     | Símbolo   | Z-score (inducción por vernalización en plantas WT) | <i>P-value</i>         | Z-score (represión en plantas <i>agl19-3</i> vernalizadas) | <i>P-value</i>         | Caja CArG en su promotor |
|-----------|---|---|------------------------|--|------------------------|--------------------------|
| AT4G11370 | RING-H2 FINGER A1A (RHA1A)                        | 6.326   | 5.75x10 <sup>-15</sup> | -6.122   | 1.16x10 <sup>-16</sup> | ✓                        |
| AT1G74900 | ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING DEFECT 43 (OTP43) | 4.128   | 9.822x10 <sup>-5</sup> | -2.959   | 0.039                  | X                        |
| AT1G19130 | Proteína de función desconocida                   | 3.860   | 0.001                  | -3.158   | 0.014                  | X                        |
| AT5G66280 | GDP-D-MANNOSE 4,6-DEHYDRATASE 1 (GMD1)            | 3.836   | 0.001                  | -2.921   | 0.046                  | ✓                        |
| AT3G12440 | Proteína de función desconocida                   | 3.812   | 0.001                  | -3.769   | 0.000                  | ✓                        |
| AT3G62950 | GRXC11  | 3.730   | 0.001                  | -3.270   | 0.007                  | X                        |

|           |   |       |       |        |       |   |
|-----------|---|-------|-------|--------|-------|---|
| AT3G03970 | SUN domain-interacting Nuclear Envelope protein 2 (SINE2) | 3.723 | 0.002 | -3.036 | 0.027 | ✓ |
| AT3G27740 | CARBAMOYL PHOSPHATE SYNTHETASE A (CARA)                   | 3.721 | 0.002 | -3.481 | 0.002 | X |
| AT3G27840 | RIBOSOMAL PROTEIN L12-B (RPL12-B)                         | 3.717 | 0.002 | -3.666 | 0.001 | ✓ |
| AT4G20690 | Proteína de función desconocida                           | 3.717 | 0.002 | -3.658 | 0.001 | X |
| AT3G44740 | Proteína de función desconocida                           | 3.698 | 0.002 | -3.745 | 0.000 | ✓ |
| AT1G16190 | RADIATION SENSITIVE23A (RAD23A)                           | 3.629 | 0.003 | -3.051 | 0.025 | X |
| AT4G14805 | Proteína de función desconocida                           | 3.589 | 0.003 | -3.256 | 0.008 | ✓ |
| AT2G02050 | Proteína de función desconocida                           | 3.361 | 0.011 | -3.467 | 0.002 | ✓ |
| AT3G45680 | NPF2.3  | 3.267 | 0.018 | -3.588 | 0.001 | X |
| AT4G02440 | EMPFINDLICH ER IM DUNKELROTE N LICHT 1 (EID1)             | 3.207 | 0.024 | -2.954 | 0.040 | X |

|           |                                       |       |       |        |       |   |
|-----------|---------------------------------------|-------|-------|--------|-------|---|
| AT3G53950 | Proteína de función desconocida       | 3.295 | 0.016 | -3.109 | 0.018 | ✓ |
| AT3G59690 | IQ-DOMAIN 13 (IQD13)                  | 3.255 | 0.019 | -3.032 | 0.027 | ✓ |
| AT3G03090 | VACUOLAR GLUCOSE TRANSPORTER 1 (VGT1) | 3.180 | 0.027 | -2.982 | 0.035 | ✓ |
| AT5G58740 | Proteína de función desconocida       | 3.040 | 0.048 | -3.251 | 0.008 | X |

Tabla 8. Genes regulados negativamente por AGL19 que requieren posiblemente de ser reprimidos por la vernalización.

| Locus     | Símbolo  | Z-score (inducción por vernalización en plantas WT) | <i>P-value</i>  | Z-score (represión en plantas <i>agl19-3</i> vernalizadas) | <i>P-value</i>  | Caja CArG en su promotor |
|-----------|--|---|-----------------|--|-----------------|--------------------------|
| AT1G32290 | Proteína de función desconocida                                | -<br>4.39093293                                     | 0.00000000<br>1 | 3.12132502<br>9  | 0.00135364<br>7 | ✓                        |
| AT1G17110 | UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 15 (UBP15)                         | -<br>2.94288201                                     | 0.00650166<br>5 | 3.88877932<br>7  | 0.00000044<br>0 | ✓                        |
| AT2G17530 | Proteína perteneciente a una superfamilia de proteínas cinasas | -<br>2.86655784                                     | 0.01101292<br>2 | 2.84166724<br>7  | 0.01146337<br>3 | X                        |
| AT1G34580 | Proteína perteneciente a una superfamilia                      | -<br>2.81592788                                     | 0.01536729<br>6 | 2.62427206<br>1  | 0.04507660<br>8 | ✓                        |

|           | de proteínas facilitadoras                          |              |             |             |             |   |
|-----------|---|--------------|-------------|-------------|-------------|---|
| AT5G58320 | NETWORKED 4A (NET4A)                                | - 2.76901706 | 0.020681694 | 3.350340071 | 0.000171880 | ✓ |
| AT4G15550 | INDOLE-3-ACETATE BETA-D-GLUCOSYLTRANSFERASE (IAGLU) | - 2.62657073 | 0.047570151 | 2.676113006 | 0.033281794 | ✓ |

En este trabajo continuamos únicamente con el análisis de los genes que se regulan positivamente por AGL19 ya que está demostrado que AGL19 es un inductor de la floración por vernalización y por lo tanto es factible pensar que AGL19 actúa para promover la floración al inducir a otros genes que a su vez promueven la floración, como ocurre con otros genes MADS-box.

## 6.2. Papel de AGL19 en la regulación de algunos genes en la respuesta a la vernalización

Paralelo al análisis del microarreglo, se hizo un experimento de RT-qPCR para analizar la expresión de algunos genes relevantes en la transición a la floración a partir de RNAs obtenidos de experimentos de vernalización independientes, para validar que el tratamiento había tenido efecto. Como se puede observar en la Figura 9, el mensajero de *AGL19* se acumula fuertemente en plantas WT después de haber sido vernalizadas en comparación con las plantas que sólo crecieron en DC por 15 días post-siembra (dps). Este resultado es el esperado e igual al reportado por Schönrock (2006). Igualmente se observa que su nivel de

acumulación disminuye considerablemente en plantas *agl19-3* en ambas condiciones de crecimiento. Por otra parte, *FLC* disminuye significativamente en las plantas WT vernalizadas con respecto al control de DC, lo que es el comportamiento esperado (Bastow et al. 2004). Interesantemente, *FLC* disminuye en *agl19-3* en condiciones de DC con respecto a las plantas WT en la misma condición, lo que sugiere que AGL19 actúa como un regulador positivo de *FLC* en DC. Sin embargo, la represión de *FLC* por vernalización sigue ocurriendo en el mutante *agl19-3*, lo que indica que la represión epigénética de *FLC* por la vernalización es independiente de AGL19.

Otro gen que participa en el proceso de vernalización como un inductor de la floración es *AGL24*, sin embargo, actualmente no se sabe si tiene una relación con *AGL19*. Tal como se tenía reportado (Michaels et al. 2003), *AGL24* se induce en plantas WT en condiciones de vernalización comparado con DC y su patrón de expresión no presenta cambios significativos en *agl19-3* en ninguna de las dos condiciones (Figura 9), por lo que, al menos a un nivel transcripcional, AGL19 no parece ser un regulador de la expresión de *AGL24*.

*FLC* es un regulador negativo de *SOC1* por lo cual al reprimirse *FLC* durante la vernalización, *SOC1* es capaz de inducirse, que es lo que observamos en la expresión relativa de *SOC1* de plantas WT vernalizadas, en comparación con las crecidas en DC (Figura 9). Encontramos que en DC hay un aumento significativo de la expresión de *SOC1* en *agl19-3* con respecto a las plantas WT, lo cual indica que AGL19 actúa como un regulador negativo de *SOC1* en esta condición. Sin embargo, no se observa una diferencia de expresión

significativa de *SOC1* al comparar plantas WT y *agl19-3* vernalizadas, por lo que AGL19 no parece regular a *SOC1* durante la vernalización. Con esto podemos decir, que el experimento de vernalización funcionó y además se descubrió que AGL19 actúa como un regulador positivo de *FLC* y negativo de *SOC1* en DC.

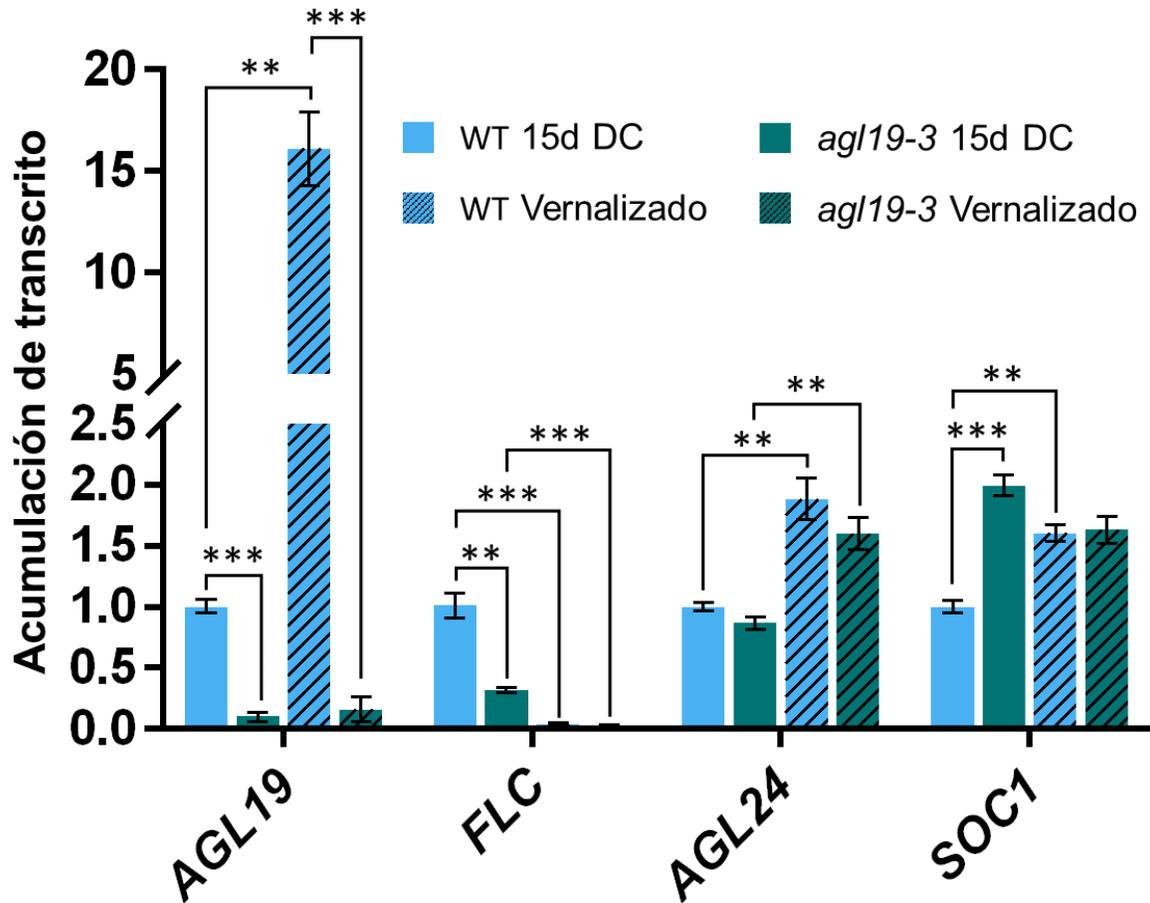


Figura 9. Acumulación relativa del transcrito de genes involucrados en el proceso de transición a la floración por vernalización. *AGL19* se induce fuertemente en las plantas WT vernalizadas y regula positivamente a *FLC* y negativamente a *SOC1* solamente en la condición de DC. Además, no tiene efecto sobre la expresión de *AGL24*. Para este análisis se utilizó toda la parte aérea de plantas crecidas en placa. Los niveles de acumulación relativa son el promedio de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas de amplificación por RT-qPCR para cada muestra  $\pm$  error estándar. Los genes de referencia utilizados para esta y subsecuentes RT-qPCRs son *PDF2* (AT1G13320) y *RNAH* (AT1G58050). Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos con la Prueba de U de Mann-Whitney (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

También se analizaron los niveles de expresión para el gen *XAL2/AGL14*, un homólogo de *AGL19*, el cual no había sido analizado en condiciones de vernalización, y de *AGL21*, el cual presenta interacciones proteína-proteína con *AGL19* (De Folter et al. 2005), así como también de acuerdo con las bases de datos de interactomas globales IntAct Molecular Interaction Database (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>) y BioGRID interaction data set (<https://thebiogrid.org/>), por lo que quisimos saber si el nivel de acumulación de su transcrito es parecido al de *AGL19*. Adicionalmente en este análisis, se incluyó a los genes de identidad del meristemo de flor *LFY* y *AP1*, los cuales indican el término de la transición a la floración y el inicio de desarrollo floral (Figura 10). El transcrito de *XAL2* presenta una acumulación similar en plantas silvestres y *agl19-3* vernalizadas. Sin embargo, las plantas *agl19-3* tienen una menor expresión de *XAL2* que en las WT, cuando las plantas crecen en DC, lo que indica que *AGL19* es un regulador positivo de *XAL2* en esta condición. Cuando se compara la acumulación relativa de transcrito *XAL2* en las plantas *agl19-3* vernalizadas con respecto a su propio control en DC, se observa un aumento significativo. Esto podría indicar que en ausencia de *AGL19*, *XAL2* puede inducirse por vernalización, posiblemente para compensar la función de *AGL19*. Aunque no hay cambios estadísticamente significativos se observa una disminución en la expresión de *XAL2* en plantas WT vernalizadas comparándolas contra WT en DC, por lo que es posible que en condiciones de vernalización *XAL2* se reprima. No encontramos cambios significativos en la acumulación de transcrito *AGL21*, aunque hay cierta disminución en las plantas *agl19-3* tanto en DC como por vernalización con respecto a las plantas silvestres, por lo cual parece que *AGL19* podría ser un potencial regulador de *AGL21*, y que hay otros factores redundantes que podrían estar involucrados, aunque esto

se tendría que probar. Los transcritos de *LFY* y *AP1* se acumulan en menor cantidad en *agl19-3* que en el WT, lo cual concuerda con su retraso en el tiempo de floración (Figura 10). Sin embargo, no se encontró un incremento relativo significativo en la expresión de *LFY* y *AP1* en plantas WT vernalizadas comparadas con su control en DC. Esto no concuerda con lo que se sabe, tomando en cuenta que la inducción de *LFY* y *AP1* es necesaria para que las plantas puedan florecer tempranamente después de la vernalización (ref). Una posible explicación, es que las plantas WT control crecidas en SD, florecieran antes de lo esperado y por lo tanto presentan la misma acumulación relativa de *LFY* y *AP1* que las plantas vernalizadas. O de forma inversa, es posible que al tiempo de la colecta de 15 dps después de la vernalización, las plantas tratadas todavía no llegaran al máximo de acumulación de estos transcritos.

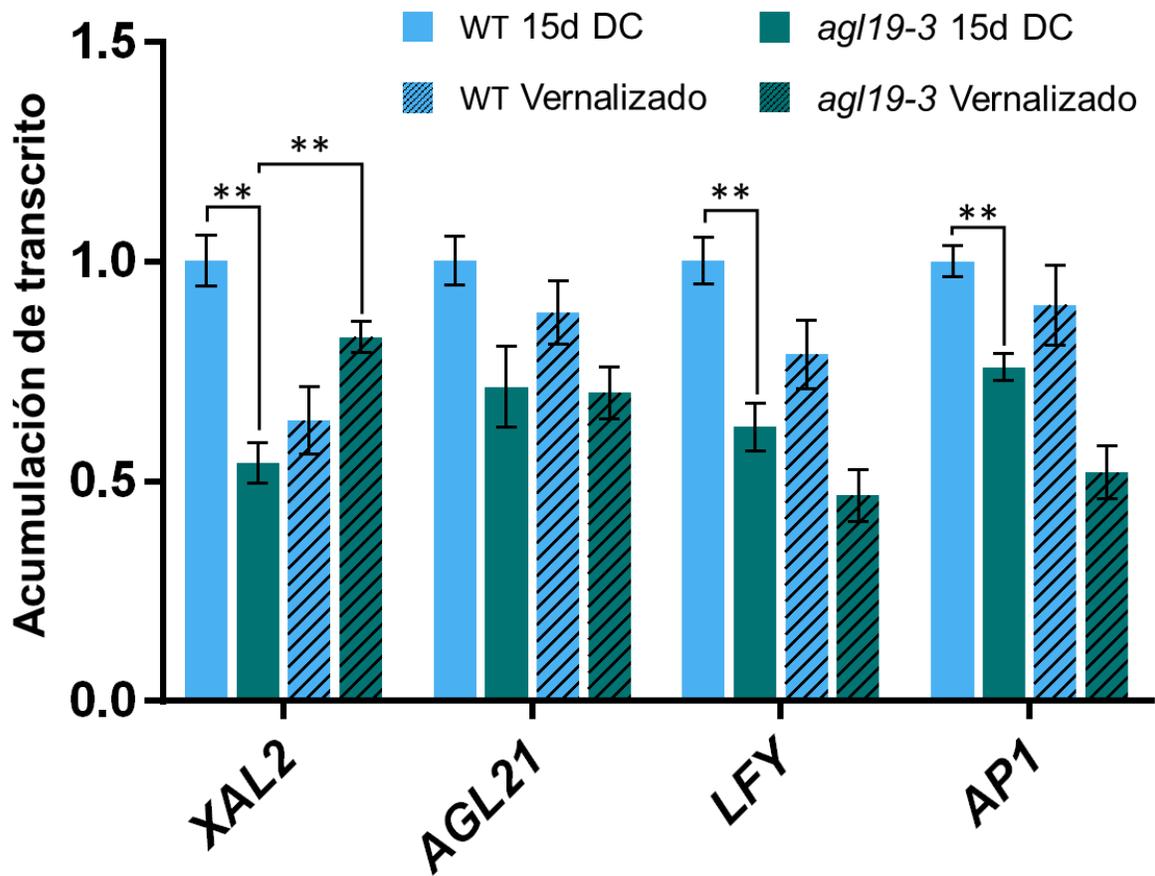


Figura 10. Acumulación relativa de transcrito de genes de floración posiblemente relacionados con *AGL19* y genes de identidad floral. *AGL19* actúa como un regulador positivo de *XAL2* en DC y en ausencia de *AGL19*, *XAL2* se induce por vernalización. *LFY* y *AP1* están disminuidos en *agl19-3* aunque no de forma significativa en las plantas vernalizadas. Los niveles de acumulación relativa son el promedio de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas de amplificación por RT-qPCR para cada muestra  $\pm$  error estándar. Datos significativos a una  $***P < 0.01$  según la Prueba de U de Mann-Whitney.

De los 20 genes que posiblemente pueden ser regulados de forma positiva por *AGL19*, se eligieron 5 para analizar sus niveles de expresión por RT-qPCR (Tabla 9): *RING-H2*, *FINGER A1A (RHA1A)*, se escogió porque es el gen con un Z-score y p-value más significativo para genes inducidos por la vernalización en plantas WT y cuya expresión era reprimida en *agl19-3*, aunque actualmente no se le ha demostrado un papel específico en *Arabidopsis*. *VACUOLAR GLUCOSE TRANSPORTER 1 (VGT1)* codifica para una proteína encargada del

transporte vacuolar de diferentes azúcares, y el mutante por inserción de T-DNA muestra un fenotipo de floración tardía en condiciones de DL (Aluri y Buttner 2007). *ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING DEFECT 43 (OTP43)* codifica para una proteína con repeticiones de pentatricopéptidos (*pentatricopeptide repeat (PPR)*) que participa en el procesamiento del RNA por *splicing*, particularmente de una subunidad del Complejo 1 de la cadena respiratoria (De Longevialle et al. 2007). Mutantes *otp43* presentan múltiples alteraciones en su desarrollo, incluyendo un fenotipo de floración tardía (De Longevialle et al. 2007). Los últimos dos genes elegidos fueron *SUN domain-interacting Nuclear Envelope protein 2 (SINE2)* que participa en la regulación de la apertura de los estomas (Biel et al., 2020) y *AT1G19130* que codifica para una proteína de función desconocida. Aunque a estos dos genes no se les ha relacionado con el proceso de transición a la floración, presentaron valores de Z-score significativos en vernalización y reducción de la expresión en *ag/19-3* en diferentes análisis independientes realizados, por lo cual también se decidió probar su expresión por RT-qPCR.

Tabla 9. Lista de genes candidatos posiblemente regulados positivamente por AGL19 durante la vernalización para validar por RT-qPCR.

| Símbolo  | Descripción TAIR   |
|--|--|
| <i>RING-H2 FINGER A1A (RHA1A)</i>                        | Codifica una proteína putativa RING-H2   |
| <i>VACUOLAR GLUCOSE TRANSPORTER 1 (VGT1)</i>             | Codifica un transportador de glucosa vacuolar localizado en la membrana que también puede transportar fructosa. Mutaciones en este gen tienen efectos en la germinación de semillas y el tiempo de floración |
| <i>ORGANELLE TRANSCRIPT PROCESSING DEFECT 43 (OTP43)</i> | Proteína de la superfamilia de repeticiones de pentatricopéptidos (PPR)  |
| <i>SUN domain-interacting NE protein 2 (SINE2)</i>       | Codifica una proteína KASH de plantas; SINE2 interactúa con SUN1 y SUN2 y se localiza en la envoltura nuclear  |
| <i>AT1G19130</i>   | Proteína <i>RmlC-like jelly roll fold</i> de función desconocida   |

Para comprobar que AGL19 efectivamente regula a los 5 genes candidatos obtenidos a partir del análisis de los microarreglos (Tabla 9), se analizó la acumulación de sus transcritos por RT-qPCR con los mismos RNAs de las figuras anteriores.

Como se observa en la Figura 11, *RHA1A* se induce significativamente por la vernalización en plantas WT, pero la acumulación de su transcrito se encuentra disminuida en *agl19-3*, lo cual indica que *RHA1A* es regulado positivamente por AGL19 durante la vernalización. La función de *RHA1A* se discute más adelante.

De los demás genes, no se encontraron cambios, con excepción de *VGT1*, para el cual en condiciones de DC se observa un aumento significativo en acumulación de su transcrito en *agl19-3* comparado con WT, por lo cual parece ser que AGL19 regula negativamente a *VGT1* en esta condición. Puesto que *RHA1A* tiene el Z-score y *p-value* más alto de los 20 genes encontrados (Tabla 7), es posible que la sensibilidad de esta técnica no sea suficiente en este caso, como para que se reflejen las diferencias por RT-qPCR en los otros genes, y en el futuro se necesitaría analizar la acumulación relativa de transcritos correspondientes a genes que tengan estos valores elevados.

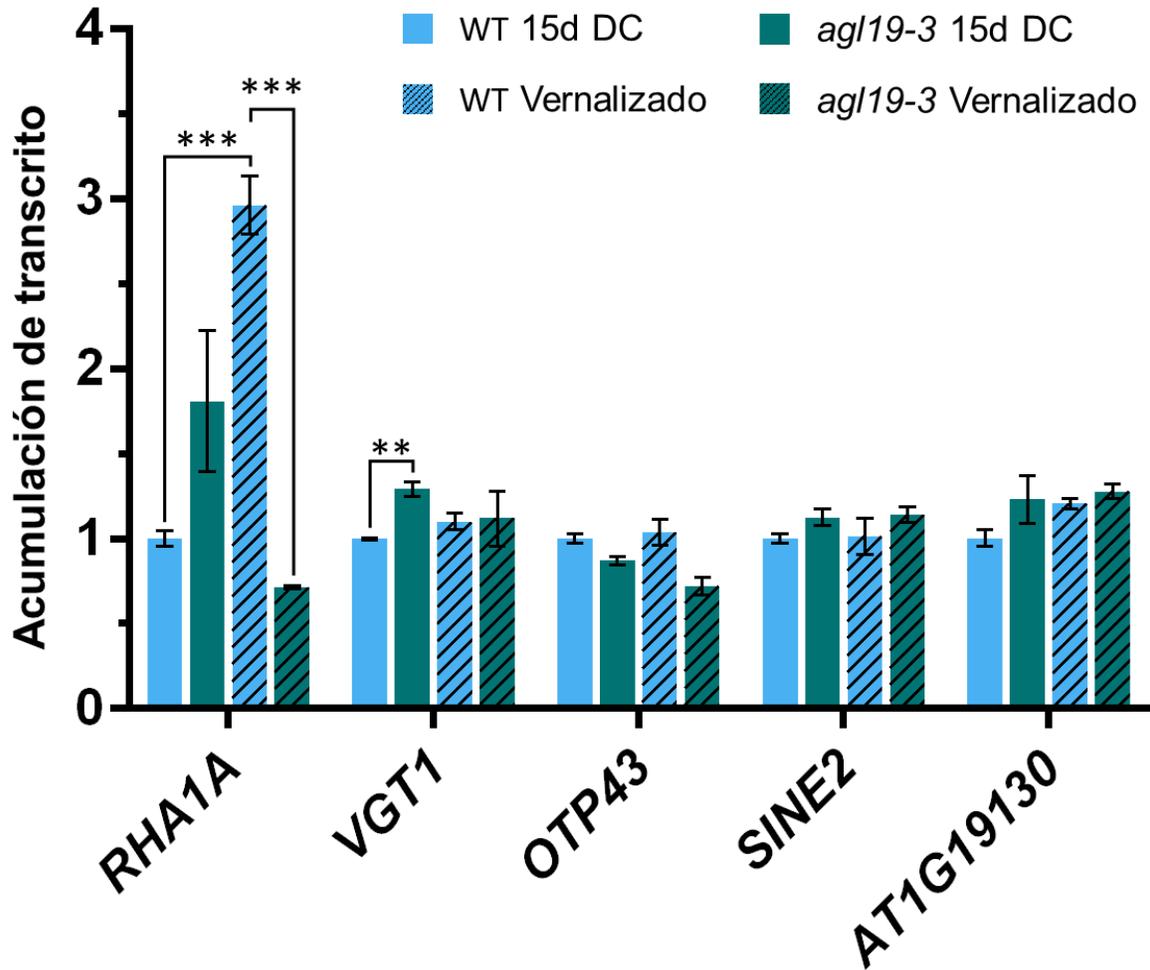


Figura 11. Validación por RT-qPCR de 5 genes probablemente regulados por AGL19 durante la vernalización. De estos genes, sólo *RHA1A* se induce por vernalización en plantas WT y es regulado positivamente por AGL19 en esta condición; AGL19 actúa como un regulador negativo de *VGT1* en condiciones de DC. Los niveles de acumulación relativa son el promedio de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas de amplificación por RT-qPCR para cada muestra  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos con la Prueba de U de Mann-Whitney (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

Por otra parte, otros de los objetivos de este trabajo están relacionados con conocer la regulación de los mensajeros alternativos de *AGL19* en respuesta a la vernalización, como se muestra a continuación.

### 6.3. Los mutantes *agl19-1* y *agl19-2* acumulan la misma cantidad del transcrito de *AGL19* que las plantas silvestres después del tratamiento de vernalización

Anteriormente se había demostrado que dos mutantes de *AGL19* por inserción de T-DNA, *agl19-1* y *agl19-2*, presentan acumulación del transcrito canónico de *AGL19*, así como también de transcritos alternativos. Por el contrario, en *agl19-3* no se observó acumulación del transcrito canónico en plantas crecidas en DL a los 14 y 40 dps. Sin embargo, el retraso más pronunciado en la floración se observa principalmente cuando las plantas son vernalizadas y crecidas en DC posteriormente (Figura 6). Por esta razón, se analizaron los niveles de acumulación del transcrito de *AGL19* en plantas crecidas en esta condición en los diferentes mutantes de *AGL19* (Figura 12). Para poder hacer dicha comparación por RT-qPCR, se utilizaron oligonucleótidos del extremo 3' del gen que se encuentran río abajo de todas las inserciones. Tanto *agl19-1* como *agl19-2* presentan una mayor acumulación del transcrito de *AGL19* en condiciones de DC con respecto a las plantas WT, mientras que en condiciones de vernalización el WT y ambos mutantes presentan los mismos niveles de acumulación y 7.5 veces más incrementados que en DC. En *agl19-3* no se observó acumulación de este fragmento en ninguna de las condiciones. Es importante señalar que debido al posicionamiento de los oligonucleótidos en exones y a que la curva de disociación mostró la amplificación de un solo producto específico, es factible pensar que el fragmento amplificado corresponde a la acumulación del transcrito de *AGL19* y no de sus transcritos alternativos (Figura 12), aunque tampoco podemos descartarlo del todo.

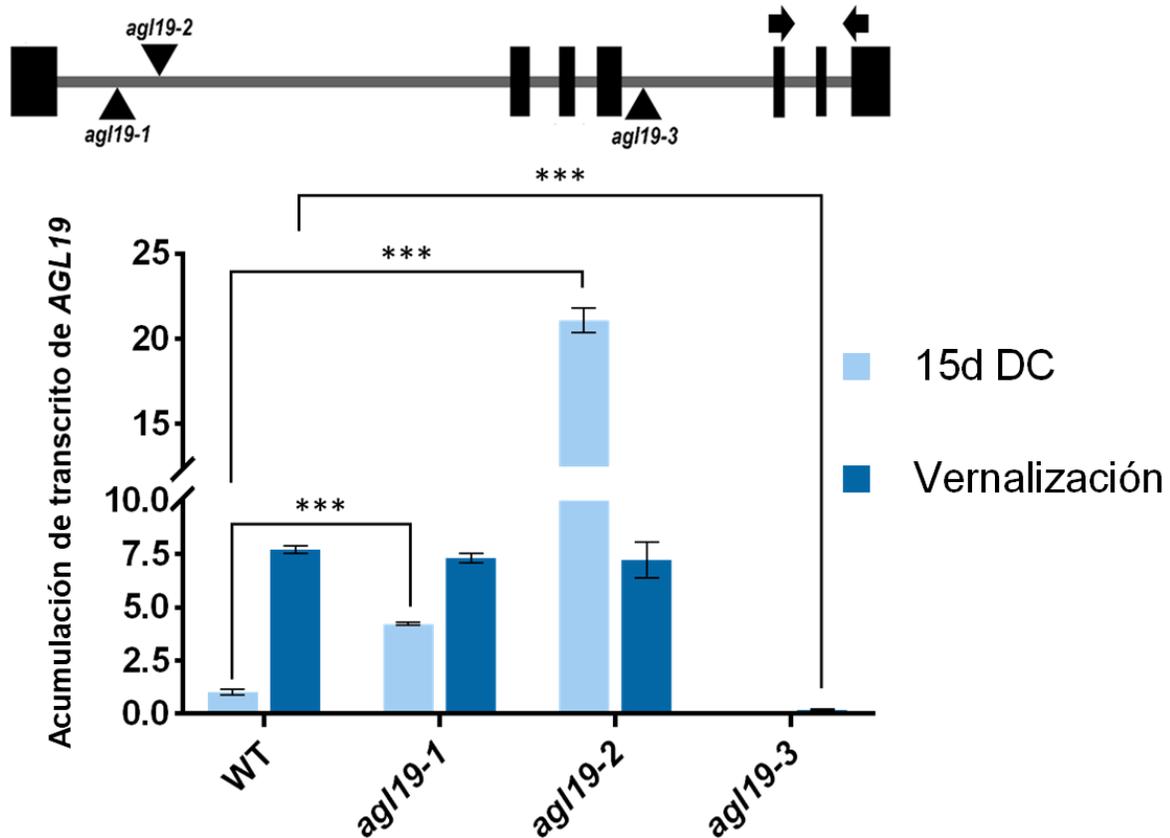


Figura 12. Acumulación relativa del transcrito de *AGL19* después de un tratamiento de vernalización en plantas WT y tres alelos mutantes *agl19* por inserción de T-DNA. En la parte superior se muestra un esquema de la estructura genómica de *AGL19* con los oligonucleótidos utilizados para este ensayo. En los mutantes *agl19-1* y *agl19-2* la abundancia de transcrito de *AGL19* en condiciones de DC es mayor que en plantas WT. En vernalización estos dos mutantes tienen abundancia de transcrito de *AGL19* similar que el WT. Los niveles de acumulación relativa mostrados son el promedio de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas para cada muestra  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos con un ANOVA de 2 vías seguido de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

Adicionalmente, para descartar la posibilidad de que estos dos mutantes *agl19* tuvieran mutaciones en el transcrito codificante de *AGL19*, que pudiera dar una proteína no funcional, se realizó la amplificación del cDNA completo de *AGL19* (660 pb) en los mutantes *agl19-1* y *agl19-2* utilizando una DNA-polimerasa de alta fidelidad (Platinum™ Pfx DNA Polymerase de Invitrogen). Los dos productos se purificaron a partir de un gel de agarosa y se reamplificaron. En efecto, al secuenciar estos productos de PCR se comprobó que ninguno

de los cDNAs de *AGL19* en estos mutantes presenta mutaciones. Con base en esta información se puede sugerir que los fenotipos de floración tardía observados en los mutantes *agl19-1* y *agl19-2* (Figura 6B) no se deben a la falta del transcrito que codifica para la proteína funcional, aunque no se puede descartar que haya procesos post-transcripcionales que puedan afectar los niveles de acumulación de la proteína. Para poder analizar esto requeriríamos de un anticuerpo específico contra *AGL19*.

#### **6.4. Las inserciones de T-DNA en los mutantes de *AGL19* alteran la acumulación de sus transcritos alternativos después de la vernalización**

Como se mencionó anteriormente, es posible que las inserciones de T-DNA en los mutantes de *AGL19* modifiquen la acumulación tanto de *AGL19* como de sus transcritos alternativos y es posible que los causantes del fenotipo de floración tardía observado en *agl19-1* y *-2* sean los transcritos alternativos que se acumulan en mayor proporción en estos alelos (Figura 6A). Anteriormente se había demostrado que los transcritos alternativos de *AGL19* son eventos de retención de intrones y al menos dos de ellos incluyen al tercer y sexto intrón (de forma independiente o en conjunto) (Yustis, 2018; Figura 6A y Figura 7). Con base en esta información se decidió analizar si las inserciones de T-DNA de los mutantes de *AGL19* modifican la acumulación de los transcritos alternativos de *AGL19* en plantas vernalizadas. Para esto se realizaron ensayos de RT-qPCR utilizando oligonucleótidos específicos para el tercer o sexto intrón de *AGL19* (Figura 13).

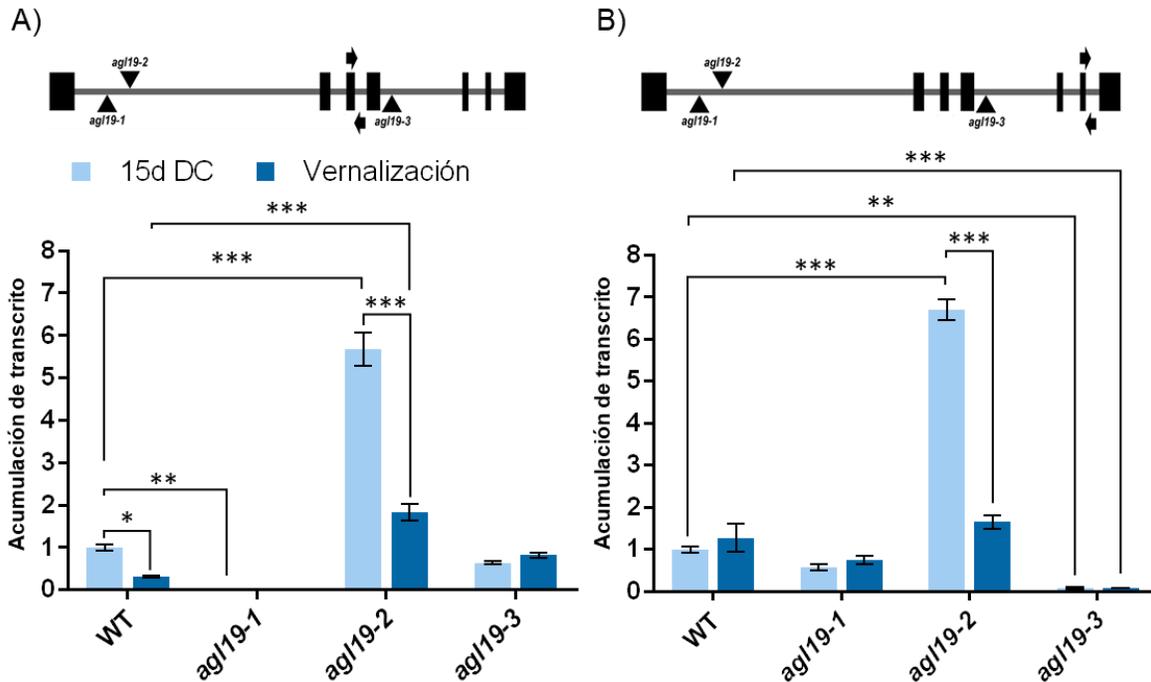


Figura 13. Acumulación de los transcritos alternativos que retienen el tercer o sexto intrón de *AGL19* después de un tratamiento de vernalización en plantas WT y tres alelos mutantes de *AGL19* por inserción de T-DNA. Dependiendo de su posición, las inserciones de T-DNA de los mutantes de *AGL19* modifican diferencialmente la acumulación de los transcritos de *AGL19* con el tercer o sexto intrón. En la parte superior se muestran los esquemas de la posición de los pares de oligonucleótidos utilizados para cada ensayo de RT-qPCR. A) Niveles de acumulación de transcritos de *AGL19* que presentan el tercer intrón. B) Niveles de acumulación de transcritos de *AGL19* que presentan el sexto intrón. Los niveles de acumulación mostrados son el promedio de 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas para cada muestra  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican cambios estadísticamente significativos con un ANOVA de 2 vías seguido de una prueba de múltiples comparaciones de Tukey (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).

De forma interesante encontramos que la acumulación de los transcritos que incluyen el 3er intrón en plantas silvestres disminuye por el efecto de la vernalización (Figura 13A). En cambio, los transcritos que incluyen el 6to intrón no presentan cambios en su acumulación con respecto a las plantas control (Figura 13B). Cabe aclarar que con estos ensayos de RT-qPCRs no podemos distinguir aquellos mensajeros que llevan ambos intrones. Al comparar entre mutantes, observamos nuevamente que *agl19-2* presenta un alto nivel de acumulación de ambos transcritos, y que la acumulación de estos transcritos disminuye

considerablemente en condiciones de vernalización (Figura 13A y B), aunque *agl19-2* mantiene mayor cantidad del mensajero con el intrón 3. Por otra parte, *agl19-1* presentó menor acumulación de ambos transcritos alternativos comparado con las plantas WT, particularmente del transcrito con el intrón 3. Por el contrario, este transcrito se encuentra acumulado en *agl19-3* de forma similar a lo que se observa en las plantas silvestres, lo que corrobora el dato de los ensayos de RT-PCRs semicuantitativas en DL (Figura 6A y 13A). Así mismo, el transcrito que retiene el intrón 6 presenta un nivel de acumulación significativamente disminuido en *agl19-3* en comparación con las plantas WT (Figura 13B). Por lo tanto, parece ser que la inserción de T-DNA específicamente en *agl19-2* incrementa en gran medida los niveles de los mensajeros alternativos en comparación con los otros alelos mutantes. Aunque de forma parecida al WT, sus niveles disminuyen considerablemente con la vernalización. Así mismo, la inserción de T-DNA en *agl19-1* no afecta los niveles del mensajero que lleva el 6to intrón, mientras que la inserción en el 4to. intrón de *agl19-3*, no afecta la acumulación del transcrito que lleva el intrón 3, pero disminuye significativamente el que lleva al intrón 6 con respecto al WT. Estos datos muestran que las inserciones de T-DNA de los 3 mutantes de *AGL19* analizados modifican diferencialmente la acumulación de los transcritos alternativos de *AGL19* que incluyen el 3er y/o el 6to intrón. Sin embargo, con excepción de los niveles aumentados del transcrito con intrón 3 en las plantas *agl19-2* vernalizadas, no se observan diferencias claras en los niveles de acumulación de estos transcritos alternativos con respecto los niveles de acumulación en las plantas silvestres en esta condición, por lo que el fenotipo de floración tardía después de

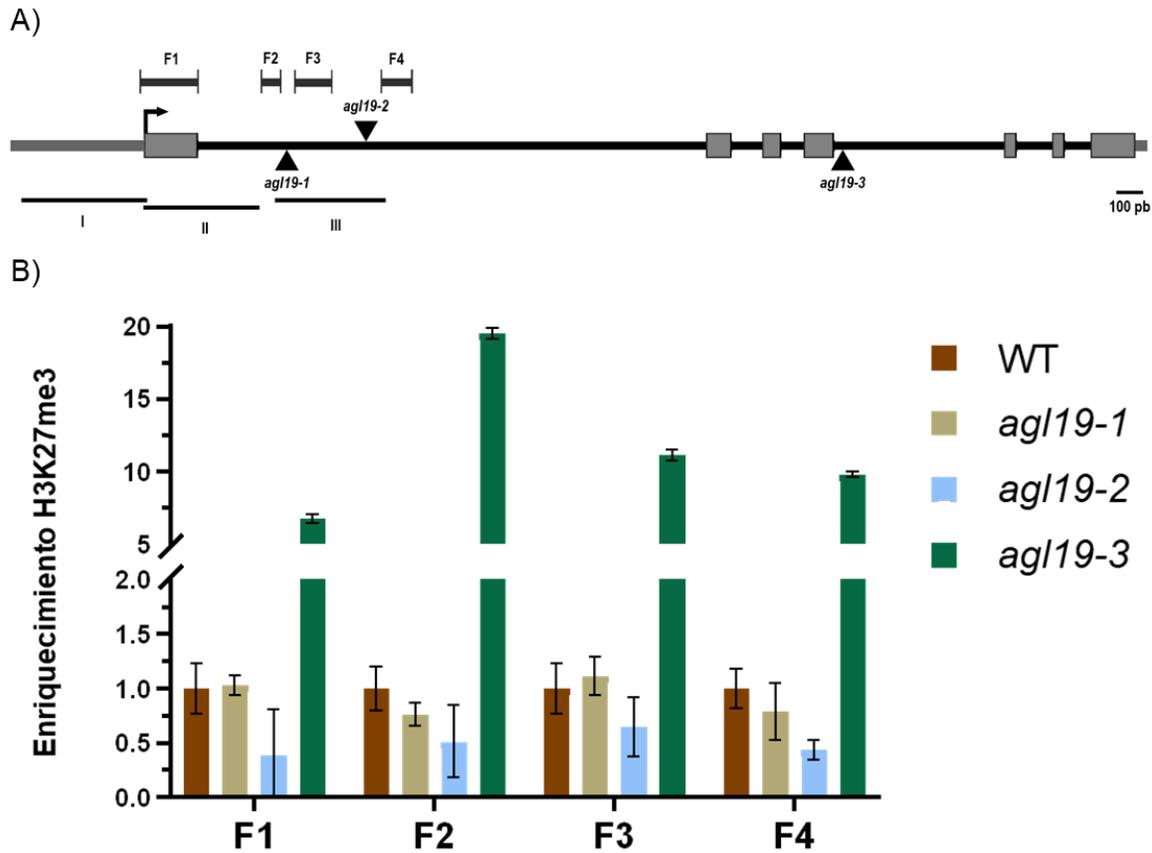
la vernalización de *agl19-1* y *-2* no correlaciona con una mayor acumulación de estos transcritos alternativos en comparación con las plantas silvestres y *agl19-3*.

Anteriormente Schönrock et al. (2006) demostraron que *AGL19* se regula por un complejo PRC2 de proteínas PcG que incluye a CLF (una metiltransferasa de histonas encargada de catalizar la deposición de H3K27me3) y nosotros demostramos que CLF regulaba a *AGL19*, así como también a sus transcritos alternativos (Figura 7A; Yustis, 2018). Debido a esto y a que pensamos que el sitio de la inserción influye sobre la expresión de los mensajeros, se decidió verificar si las inserciones de T-DNA en *AGL19* podrían estar afectando los niveles de acumulación de H3K27me3 sobre este locus.

## **6.5. Las inserciones de T-DNA modifican el enriquecimiento de H3K27me3 en la región 5' de *AGL19***

Previamente ya se demostró que la mayor acumulación de H3K27me3 sobre *AGL19* se encuentra en el extremo 5' del primer intrón (Schönrock et al. 2006). Mediante ensayos de CHIP-qPCR con oligonucleótidos diseñados dentro de esta misma región (Figura 14A) se analizaron los niveles de acumulación de H3K27me3 en plantas WT y *agl19-1*, *-2* y *-3* de 40 días crecidas en DL (Figura 14B), que es una condición donde se acumulan fuertemente los transcritos alternativos. Como se observa en la Figura 14B, *agl19-1* presenta niveles de enriquecimiento de la H3K27me3 similares al WT en todos los fragmentos analizados, mientras que *agl19-2* presenta niveles reducidos de H3K27me3 con respecto al WT. En el caso del alelo *agl19-3* en los 4 fragmentos analizados se observa un abrupto aumento en el enriquecimiento de la H3K27me3, con respecto al WT y a los otros dos alelos. Esto

correlaciona bien con los niveles de transcritos que observamos previamente, siendo *agl19-2* el que tiene mayor acumulación de transcritos y *agl19-3* menor cantidad (Figura 6 y 12).



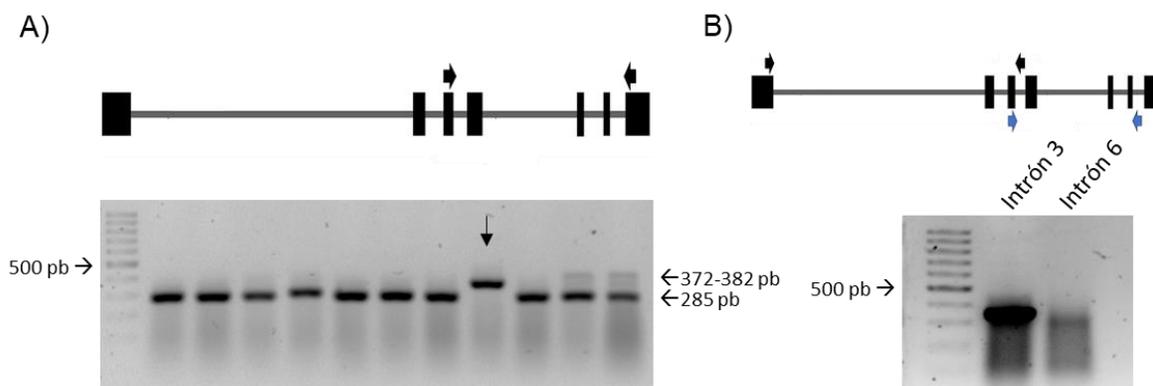
**Figura 14. Niveles de enriquecimiento sobre el input de H3K27me3 sobre la región 5' de *AGL19*.** A) Esquema del locus de *AGL19* y posición de las inserciones de T-DNA de cada uno de los alelos mutantes analizados, así como de los oligonucleótidos utilizados para el análisis por qPCR (F1-4) y de los fragmentos previamente analizados por Schönrock et al (2006) (I-III). B) ChIP-qPCR de los niveles de enriquecimiento de H3K27me3 sobre la región 5' de *AGL19*. Los niveles de enriquecimiento de H3K27me3 y de la histona H3 se normalizaron con respecto a un *input* y después se normalizaron los niveles de enriquecimiento de H3K27me3 con los de la histona H3. Se muestran los datos de 6 réplicas técnicas de una réplica biológica representativa. Se realizaron dos réplicas biológicas independientes (Ver Figura suplementaria 1 para la segunda replica biológica). Hojas de plantas de 40 dps crecidas directamente en sustrato en condiciones de DL.

## 6.6. Clonación de *AGL19* y sus transcritos alternativos

En este momento, no sabemos si los transcritos alternativos pueden tener una función como mensajeros no codificantes, o si se pueden traducir generando proteínas truncadas. En otros

genes MADS-box como *FLM* y *MAF2* se ha reportado este último caso, en donde dependiendo de la isoforma, producto de un proceso de *splicing* alternativo, que se produzca principalmente, la planta presentará un fenotipo diferente (Posé et al. 2013; Airoidi, McKay, y Davies, 2015). Para resolver si los mensajeros alternativos tienen una función y afectan el fenotipo de la planta, deseamos sobreexpresarlos en plantas transgénicas y analizar sus fenotipos de floración. Es muy posible que no tengamos toda la familia de transcritos alternativos de *AGL19*, sin embargo, los mensajeros con retención de los intrones 3 y 6 se amplifican de forma recurrente. Se decidió clonar cada uno de estos transcritos alternativos de forma independiente. Inicialmente se realizó una RT-PCR de *AGL19* a partir de RNA de plantas WT vernalizadas por 8 semanas seguido de un periodo de crecimiento de 15 días en DC, con oligonucleótidos que abarcaban toda la región codificante (660 pb) incluyendo el codón de término y a partir de esta reacción de PCR se realizó la ligación con el vector pJET1.2/blunt. Con esta reacción de ligación se transformaron células competentes de *E. coli*. Ya que se utilizó toda la reacción de la PCR para la clonación, en la población de células transformadas se encontraban representados tanto el transcrito codificante de *AGL19* como sus transcritos alternativos. Se hicieron minipreps de 50 clonas al azar, y mediante PCRs se observó el tamaño de los amplicones y se escogieron aquellos que tenían un tamaño mayor al codificante (Figura 15A). Posteriormente se hizo una segunda amplificación para ver si contenían el intrón 3 o 6, ya que son de tamaños similares (Figura 15B). Se secuenció para confirmar que no hubiera otras mutaciones introducidas por la polimerasa. Así se obtuvo el transcrito que retiene el intrón 3 el cual se denominó *AGL19int3*. Junto con los transcritos

alternativos de *AGL19* también se clonó el transcrito codificante de *AGL19*, esto para utilizarlo como un control para las construcciones de sobreexpresión.



**Figura 15. Comprobación por PCR de la clonación de *AGL19* y sus transcritos alternativos.** A) Amplificaciones por PCR realizadas para detectar la presencia de transcritos alternativos de *AGL19*. El transcrito codificante mide 285 pb. La flecha vertical indica la colonia seleccionada para comprobar el intrón retenido. B) Amplificación por PCR para detectar la presencia del tercer o sexto intrón a partir de la colonia seleccionada en (A). El fragmento amplificado que contiene el intrón 3 es de 355 pb, y el que contiene el sexto intrón es de 308 pb. En la parte superior de cada panel se muestra la posición de los oligonucleótidos utilizados para cada PCR. En (B), las flechas negras indican los oligonucleótidos utilizados para la PCR para el tercer intrón y las azules para el sexto intrón.

## 7. Discusión

Las plantas tienen la capacidad de utilizar distintos mecanismos moleculares los cuales les permiten censar una gran variedad de señales, tanto exógenas como endógenas, para poder sincronizar la floración con las condiciones ambientales más favorables para cada especie (Amasino, 2010). Los genes involucrados en estos procesos son componentes de una red de regulación genética que le permite integrar todas estas señales (Bloomer y Dean, 2017).

Los genes MADS-box tienen relevancia en la transición a la floración y en el desarrollo del meristemo de flor, entre otras funciones en el desarrollo de las plantas (Saedler et al. 2001; Smaczniak et al. 2012). El presente trabajo se enfocó en analizar el papel del gen *AGL19* en el proceso de transición a la floración en respuesta a la vernalización y en analizar la expresión de los transcritos alternativos generados a partir de este locus con vías a entender su posible función en la regulación de este proceso. También analizamos el efecto que tienen las inserciones de T-DNA en tres alelos mutantes en *AGL19*, las cuales modifican tanto la acumulación del transcrito codificante como la acumulación de dos de sus transcritos alternativos, para tratar de entender el fenotipo de floración tardía después de la vernalización observado en estos mutantes.

### 7.1. Papel de *AGL19* en la regulación de genes involucrados en el proceso de vernalización y en día corto

Cuando se comenzó este trabajo no se había realizado ningún análisis transcriptómico del efecto de la vernalización en *Arabidopsis*, hasta recientemente que se publicó un estudio de

Xi et al. (2020). En este estudio se analizó el perfil transcriptómico y epigenómico de plantas crecidas primero por 7 días a 22°C seguido de un tratamiento de frío a 4°C por periodos desde 1 hora, 1 día, 10, 20 hasta 40 días en un fotoperiodo de DC, así como plantas con un tratamiento de vernalización a 4°C por 40 días que subsecuentemente se pasaron a 22°C por 10 días; comparadas con plantas sin vernalizar. En este trabajo se encontró que la vernalización genera cambios globales en los patrones de H3K4me3, los cuales los autores hipotetizan que coordinan procesos como la fotosíntesis y previenen el daño por estrés oxidativo durante el frío. La marca H3K27me3 por su parte, coincide particularmente con genes que codifican para factores de transcripción que participan en diversos procesos del desarrollo en Arabidopsis. Mediante la utilización de un algoritmo de deformación dinámica del tiempo, el cual se utilizó para encontrar patrones de expresión genética similares en distintos tiempos, se encontró un grupo de genes que presentaban un patrón de expresión similar al de *FLC*, es decir que se reprimían gradualmente conforme aumentaba el tiempo de vernalización; al realizar un análisis de ontología génica (*Gene Ontology* (GO)) no se encontró ningún término funcional que estuviera enriquecido en este grupo de genes. Igualmente, se encontró otro grupo de genes cuyos patrones de expresión eran similares a *VIN3*, es decir, son inducidos gradualmente por la vernalización. El análisis GO mostró que genes involucrados en procesos de movimiento mediante microtúbulos se encontraban enriquecidos en este grupo similar a *VIN3*. En el mismo artículo sugieren que estos dos grupos de genes con patrones de expresión similares a *FLC* y *VIN3* pueden ser componentes novedosos del proceso de vernalización (Xi et al. 2020). También se encontraron dos grupos de genes, los cuales presentaban una inducción y represión constantes durante la

vernalización, respectivamente. El análisis de términos funcionales del grupo de genes inducidos de forma constante mostró la presencia genes involucrados en la síntesis de ribosomas, inicio de la traducción, desenrollamiento de la estructura secundaria del RNA y procesamiento del RNA, lo cual parece sugerir que la síntesis de proteínas se encuentra aumentada durante periodos prolongados de frío, probablemente para compensar la actividad enzimática reducida a bajas temperaturas (Xi et al. 2020). En el grupo de los genes reprimidos de forma constante durante la vernalización se encontraron genes involucrados en la fotosíntesis y procesamiento de lípidos. Los autores sugieren que estos genes se encuentran reprimidos para evitar daño foto-oxidativo provocado por la producción excesiva de energía (Xi et al. 2020). En este estudio *AGL19* y *AGL24*, los dos genes que hasta el momento se han descrito como promotores de la floración en respuesta a la vernalización, no aparecen como genes diferencialmente expresados. Sin embargo, al analizar los datos crudos del RNA-seq parece que pertenecen a un grupo de genes cuya expresión aumenta gradualmente al pasar el tiempo de vernalización y se mantienen inducidos al regresar a temperaturas más cálidas.

*AGL19* es un factor de transcripción con dominio MADS que actúa como un promotor de la floración en respuesta a la vernalización y como se ha demostrado antes (Schönrock et al. 2006) y en este trabajo se expresa fuertemente en respuesta a la vernalización. Sin embargo, hasta el momento no se conocían genes regulados por *AGL19* durante este proceso. Para empezar a elucidar el papel de *AGL19* en la vernalización se analizaron los datos de un microarreglo previamente realizado en el laboratorio. En este microarreglo se

compararon plantas WT y mutantes *agl19-3* con y sin un tratamiento de vernalización de 8 semanas, con el fin de encontrar genes de respuesta a la vernalización y que además fueran regulados por AGL19. Quisimos enfocarnos en genes que posiblemente participaran en la inducción a la floración, por lo que después de la vernalización las plantas fueron crecidas durante 15 días en un fotoperiodo de DC, ya que es en esta condición donde se reportó el fenotipo de floración tardía de los mutantes *agl19-1* y *agl19-2* (Schönrock et al. 2006).

Dentro de los genes diferencialmente expresados obtenidos de nuestro microarreglo se escogieron 5 genes para analizar la acumulación de sus transcritos por RT-qPCR. De estos, sólo uno, *RHA1A*, mostró un aumento en su acumulación de transcrito en plantas WT vernalizadas en comparación con los controles en DC, así como una disminución en plantas *agl19-3* vernalizadas, lo cual indica que AGL19 regula positivamente a *RHA1A* después de la vernalización (Figura 11). *RHA1A* pertenece a la familia de proteínas E3 ubiquitín-ligasas con un dominio RING-H2. En *Arabidopsis* existen 40 genes que codifican para esta familia de proteínas (Lechner et al. 2002). Dos de estas, *RHA2A* y *RHA2B*, participan en la señalización de ácido abscísico (ABA) y en la respuesta al estrés abiótico (Bu et al. 2009; Li et al. 2011). Aunque se tiene evidencia del papel del ABA en la respuesta a estrés por frío, parece ser que esta respuesta mediada por ABA actúa por mecanismos independientes a los que actúan en la vernalización, ya que mutantes de la vía del ABA no presentan un defecto en la respuesta a esta condición (Chandler, Martinez-Zapater, y Dean, 2000; Liu et al. 2002). Sin embargo, las proteínas E3 ubiquitín ligasas están implicadas en muchos procesos del desarrollo en plantas y se tiene evidencia de que HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES

1 (HOS1), una E3 ubiquitín ligasa con un motivo RING, actúa como un activador de *FLC* al degradar una desacetilasa de histonas, HDA6, durante periodos cortos de estrés por frío (Jung et al. 2013). Es posible que RHA1A, inducido por AGL19, degrade a proteínas que actúan como represores de la floración, sin embargo, debido a la alta redundancia que existe en la familia RING H2, es posible que esta acción se realice en conjunto con otras proteínas de esta familia. En el análisis de Xi et al. (2020), uno de los genes que se induce por la vernalización a los 40 días de tratamiento es *RHA2B*, un gen estrechamente relacionado con *RHA1A*, por lo que las proteínas producto de estos genes podrían tener un papel similar en este proceso. El estudio de los fenotipos de floración en condiciones de vernalización de los mutantes simples y de los dobles *agl19-3 rha1a* y *rha1a rha2b*, puede ayudar a entender el papel que tienen estas proteínas en este proceso.

AGL19 reprime parcialmente la expresión de *VGT1* en DC, pero no está involucrado en la regulación de su expresión por la vernalización (Figura 11). *VGT1* es un transportador vacuolar de glucosa y resulta interesante que el mutante *vgt1* presenta un fenotipo de floración tardía en DL (Aluri y Buttner, 2007). Los autores discuten que el fenotipo observado es debido a la posible función de la acumulación vacuolar de la glucosa (y otras hexosas) en la formación o mantenimiento de la turgencia celular para llevar a cabo procesos de expansión celular. Otra evidencia de la importancia de los azúcares en la transición a la floración es la trehalosa-6-fosfato, la cual actúa como una molécula señalizadora que indica la disponibilidad de carbohidratos a otras vías de señalización (Ponnu, Wahl, y Schmid, 2011; Wahl et al. 2013). Es posible que en condiciones no inductivas de la floración (en las cuales

la acumulación de suficiente cantidad de carbohidratos para sustentar la reproducción lleva más tiempo) AGL19 regule a VGT1 de manera negativa durante la fase vegetativa para impedir que la planta florezca antes de tiempo. El estudio del fenotipo de mutantes *vgt1* en condiciones de DC y vernalización podría ayudar a entender el papel que juega el transporte de azúcares en el proceso de transición a la floración por vernalización. De igual forma es factible pensar que la regulación de *VGT1* por AGL19 esté relacionada con otro proceso ajeno a la transición a la floración.

Aunque no se analizó por RT-qPCR la acumulación de transcrito de los genes que eran regulados negativamente por AGL19 después de la vernalización, en este grupo se encontraron genes involucrados en la síntesis de auxinas *INDOLE-3-ACETATE BETA-D-GLUCOSYLTRANSFERASE (IAGLU)*, regulación del tamaño de vacuolas *NETWORKED 4A (NET4A)* y degradación de proteínas *UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 15 (UBP15)*. Hasta el momento, ninguno de estos genes ha sido involucrado directamente en el proceso de transición a la floración, o en la aclimatación de las plantas a periodos prolongados de frío. Se requiere de la confirmación por RT-qPCR para establecer que sean regulados por AGL19 y conocer si realmente actúan como represores de la floración en respuesta a la vernalización como lo sugiere el análisis del microarreglo.

## **7.2. AGL19 regula a genes involucrados en la transición a la floración**

Adicionalmente a la búsqueda de nuevos genes que fueran regulados por AGL19 en respuesta a la vernalización, también se analizó la expresión de genes que se conoce que participan en este proceso como son: *AGL24*, *FLC*, *SOC1*, *LFY* y *AP1* (Alexandre y Hennig,

2007; Alexandre y Hennig, 2008). Como se esperaba, *AGL24* y *SOC1* se indujeron y *FLC* se reprimió en respuesta a la vernalización (Figura 9). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que *AGL19* no interfiere en esta respuesta. Se ha demostrado que *AGL24* se induce por la vernalización por una vía independiente de *FLC* (Michaels et al. 2003) y funciona como un promotor de la floración, al igual que *AGL19*. Aunque no se encontró regulación de *AGL24* por *AGL19*, no hay evidencia de si *AGL24* regula a *AGL19*, además de su posible interacción genética. Como se sabe, los factores de transcripción con dominio MADS, forman dímeros y tetrámeros, por lo que cabe la posibilidad de que durante el proceso de vernalización *AGL19* y *AGL24* interactúen formando un complejo que promueva la floración.

*LFY* y *AP1*, dos genes de identidad del meristemo floral, reducen su acumulación de transcrito en *agl19-3*, lo cual concuerda con el fenotipo de floración tardía de este mutante tanto en DC como en plantas vernalizadas (Figura 10). Sin embargo, inesperadamente, no se observó un aumento en la expresión de *LFY* y *AP1* en plantas silvestres vernalizadas comparadas con su control en DC. Al analizar los datos absolutos de la qPCR, la acumulación de transcrito de estos dos genes es similar tanto en plantas crecidas por 15 dps en DC como en plantas vernalizadas por 8 semanas seguido de un periodo de crecimiento por 15 días en DC. Es decir, las plantas en DC ya habían alcanzado el tiempo de transición a la floración cuando se colectaron las muestras, y por lo tanto los niveles de acumulación de transcrito de *LFY* y *AP1* eran similares a los de plantas vernalizadas, que se sabe florecen con anterioridad. Por esto, no se observan cambios en su expresión comparando plantas WT en DC contra vernalizadas. Las plantas utilizadas para estos experimentos se crecieron en placas con medio

MS 0.2X sólido suplementado con sacarosa al 1% y se sabe que el crecimiento en medios artificiales pueden modificar la respuesta de las plantas a distintos estímulos ambientales (Xu et al. 2013). Es posible que en estas condiciones a los 15 días de crecimiento en DC se adelanten todos los procesos del desarrollo de *Arabidopsis*, incluida la transición a la floración, lo cual a su vez da como resultado el aumento temprano en la expresión de *LFY* y *AP1*, inclusive en condiciones de crecimiento no inductivas.

Adicionalmente se encontró que *AGL19* actúa como un regulador positivo de *FLC* en DC (Figura 9). Aunque no se conoce mucho del papel de *FLC* en condiciones de DC, un estudio de la diversidad de respuestas a la floración en poblaciones naturales de *Arabidopsis* encontró que *FLC* (junto con *FRI*) afectaban significativamente la floración en condiciones de DC en un grupo amplio de poblaciones naturales de *Arabidopsis* (Lempe et al. 2005). También se tiene evidencia de que *FLC* interactúa con proteínas DELLA, las cuales funcionan como represoras de factores de transcripción que inducen la floración y se promueve su degradación en presencia de las fitohormonas giberelinas (Li et al. 2016). Considerando que en DC *AGL19* se encuentra reprimido por proteínas PcG y desacetilasas de histonas (Schönrock et al. 2006; Kim et al. 2013; Kang et al. 2015), en una planta silvestre no hay niveles elevados de *AGL19*. Aun así, en el mutante *agl19-3*, se observa la disminución de la acumulación de *FLC* y esto puede hacer que aumenten los niveles de acumulación de *SOC1*, puesto que *FLC* es un represor de la expresión de éste (Helliwell et al. 2006). O bien, puede ser que *AGL19* regule a *SOC1* por otro mecanismo independiente de *FLC*. Sin embargo, esto no concuerda con el fenotipo de floración de las plantas mutantes *agl19-3* en DC, en las

cuales se observa un ligero, pero significativo retraso en su tiempo de floración (Figura 6B) y no una floración temprana como se esperaría si hay una mayor expresión de *SOC1*. El fenotipo de floración tardía de *agl19-3* indica que *AGL19* es un promotor de la transición al estado reproductivo tanto en DC como en respuesta a la vernalización. Cabe señalar que las muestras de donde se extrajo el RNA para realizar estos ensayos de RT-qPCRs provienen de la parte aérea de plántulas completas que tenían tanto hojas como meristemas y fueron crecidas en presencia de sacarosa. Debido a todo esto, es difícil sacar conclusiones sobre las regulaciones antes expuestas, ya que podría haber una sobre estimación o incluso una compensación de la acumulación de los transcritos en las hojas con respecto al SAM. Esto es importante de mencionar ya que se sabe que *AGL19*, *FLC* y *SOC1* se expresan en las hojas donde pueden tener funciones diferentes a la regulación de la floración. Por ejemplo, *FLC* participa en el desarrollo de tricomas entre otras funciones en el desarrollo de *Arabidopsis* (Chiang et al. 2009; Deng et al. 2011; Willmann y Poethig, 2011; Blair, Auge, y Donohue, 2017), lo mismo que *SOC1* que se le ha implicado en la regulación de la respuesta a periodos cortos de frío (Lee y Lee, 2010) y en la apertura de estomas (Kimura et al. 2015). Se requiere de otros análisis para demostrar el posible papel de *AGL19* sobre la regulación de *FLC* y *SOC1* y su posible implicación ya sea en la transición a la floración o en otros procesos. Con este propósito, se analizarán las hojas de roseta y tejido enriquecido en SAM por separado de plantas crecidas en tierra en DC con y sin vernalización.

*XAL2* es homólogo de *AGL19* y podría llevar a cabo la función de este en su ausencia. En el mutante *agl19-3*, la acumulación de transcrito de *XAL2* aumenta con la vernalización

de forma que podría compensar la función de AGL19, al menos parcialmente. Así mismo, en DC, AGL19 regula positivamente a XAL2 y este último funciona como un inductor de la floración en DC y en respuesta a giberelinas (Pérez-Ruiz et al. 2015), lo que sugiere que al menos en DC ambos podrían actuar como reguladores positivos de la floración. En este sentido, se ha propuesto que la alta redundancia funcional presente en los genes MADS-box confiere un cierto grado de robustez en el desarrollo de las plantas (Rijpkema, Gerats, y Vandenbussche, 2007).

### **7.3. Efecto de las inserciones de T-DNA en la regulación de *AGL19* en tres mutantes alélicos**

Uno de los objetivos de este trabajo fue tratar de explicar el hecho de que tres mutantes por inserción de T-DNA en *AGL19* (*agl19-1*, *-2* y *-3*) presentan el mismo fenotipo de floración tardía después de un tratamiento de vernalización seguido por un periodo en DC, sin embargo, *agl19-1* y *-2* presentan acumulación del transcrito codificante de *AGL19*, mientras que *agl19-3* no (Figura 6). Además, en *agl19-1* y *-2* se observa la acumulación temprana de algunos transcritos de mayor tamaño al codificante, comparado con plantas WT (Figura 6A). Dentro de estos transcritos se han detectado aquellos con eventos de retención de intrones, específicamente el 3 y el 6, los cuales pueden estar por separado o retenerse en el mismo transcrito. Debido a esto se hipotetizó que el fenotipo de floración tardía observado en *agl19-1* y *-2* era debido a la presencia de estos transcritos, producto de un *splicing* alternativo, los cuales pudieran estar actuando para inhibir la actividad de AGL19, ya sea como transcritos no codificantes o como proteínas. Para comprobar esta hipótesis, primero

se analizó la abundancia de dos de estos transcritos de *AGL19* (los que retienen al intrón 3 y 6 por separado) en los tres mutantes después de un tratamiento de vernalización seguido de un periodo de crecimiento de 15 días en DC por RT-qPCR (Figura 12). Los resultados demuestran que la acumulación del transcrito canónico de *AGL19* en plantas vernalizadas *agl19-1* y *-2* es similar a su acumulación en el WT y por lo tanto es factible pensar que esto mismo ocurre con la proteína. Sin embargo, estos dos mutantes presentan el mismo fenotipo de floración tardía que *agl19-3*, donde no se observa acumulación de *AGL19*. Además, se comprobó que el transcrito canónico de *AGL19* en *agl19-1* y *-2* no presentaba ningún tipo de mutaciones, por lo cual la proteína de *AGL19* que se sintetiza en estos mutantes sería funcional. Una hipótesis para intentar explicar este fenómeno es que los transcritos alternativos actúen como transcritos no codificantes que pudieran interferir con la traducción de *AGL19*. Existe una gran cantidad de evidencia del papel que tienen los transcritos no codificantes de *COOLAIR* en la regulación de *FLC* durante la vernalización. Los transcritos de *COOLAIR* regulan a *FLC* de diferentes formas, principalmente al reducir la acumulación del transcrito de *FLC* al transcribirse de forma excluyente con este y al modular sus patrones de *splicing* (Qi et al. 2019). Se analizó la acumulación de estos transcritos alternativos con oligonucleótidos específicos para los intrones retenidos mediante RT-qPCR en muestras de plantas crecidas en DC y con un tratamiento de vernalización, y además de un aumento en la acumulación del transcrito con el intrón 3 en plantas *agl19-2* vernalizadas comparadas con su control WT (Figura 13A), no se logró establecer una correlación directa entre una mayor acumulación de estos transcritos alternativos con el fenotipo observado en el tiempo de floración de los mutantes. Otra posibilidad, es que los transcritos alternativos

sean traducidos en proteínas truncadas que estén funcionando como dominantes negativos al interferir con la función de AGL19. Esto se tendrá que demostrar más adelante. Un análisis *in silico* de las proteínas producto de los transcritos alternativos que retienen los intrones 3 y/o 6 muestra que estas proteínas presentarían los dominios MADS y parte del dominio Intermedio, en el caso de la traducción de los transcritos con la retención del intrón 3 y la retención de ambos intrones, y para el caso de la traducción del transcrito con el intrón 6, esta presentaría todos los dominios (MADS, I y K) a excepción del dominio C terminal (Yustis, 2018). Estos análisis nos indicarían que de traducirse, estas proteínas podrían competir con la proteína canónica de AGL19 por los mismo sitios de unión al DNA debido a la presencia del dominio MADS, y en el caso de la proteína con el intrón 6, podría competir con AGL19 en la unión al DNA y además podría interferir o secuestrar a otras proteínas con las cuales interactúa AGL19, debido a la presencia del dominio K.

#### **7.4. Las inserciones de T-DNA modifican el ambiente epigenético dentro del locus de *AGL19***

En *Arabidopsis* se tiene evidencia de que las inserciones de T-DNA pueden afectar tanto los patrones de metilación del DNA (Jia et al. 2015; Sandhu, Koirala, y Neff, 2013), como la estructura de la cromatina (Jupe et al. 2019), así como también la topología y estructura tridimensional del DNA (Gelvin y Kim, 2007; Osabe et al. 2017), por lo cual el efecto de las inserciones de T-DNA en los fenotipos de los mutantes *agl19-1* y *agl19-2* y niveles de acumulación de transcritos de *AGL19* observados podría involucrar diferentes mecanismos.

Se tiene evidencia de la existencia de motivos de unión de factores transcripcionales que son capaces de reclutar complejos Polycomb para reprimir a sus genes blanco, conocidos como *Polycomb Response Elements* (PREs) (Xiao et al. 2017). Se realizó una búsqueda de PREs previamente identificados que se encuentran sobre el primer intrón de *AGL19* y se compararon contra los sitios de inserción de los T-DNAs de los alelos *agl19-1* y *agl19-2*, para conocer si estas inserciones pudieran estar afectando los sitios de unión de estos PREs (Yustis, 2018). Mediante la herramienta de *Gene Analysis* del portal AthaMap ([http://www.athamap.de/search\\_gene.php](http://www.athamap.de/search_gene.php)). Se encontró que en el caso del alelo *agl19-2* la inserción del T-DNA se encuentra exactamente en el sitio de unión de un factor transcripcional de la familia C2H2 (Zn) (Yustis, 2018; Tesis de licenciatura, UNAM), una familia de factores transcripcionales que se sabe se unen a PREs y son capaces de reclutar directamente a complejos Polycomb (Xiao et al. 2017). Debido a esto se decidió analizar si las inserciones de T-DNA podrían estar afectando la deposición de marcas epigenéticas represoras, específicamente la trimetilación de la K27 de la histona H3 dentro del locus de *AGL19*, ya que se tiene reportado que este tipo de modificaciones epigenéticas regulan a *AGL19* (Figura 14). Mediante ensayos de ChIP-qPCR en plantas de 40 días crecidas en DL se encontró que las inserciones de T-DNA en *agl19-2* y *agl19-3* modifican, a la baja y a la alta, respectivamente, los niveles de H3K27me3 en la región 5' de *AGL19* (Figura 14B). En el caso de *agl19-2* es posible que la inserción de T-DNA interfiera con el posicionamiento de la marca H3K27me3 modificar el sitio de unión de un factor transcripcional C2H2 (Zn), lo cual a su vez no permite que este reclute al complejo represor, y esto se traduce en una menor acumulación de H3K27me3 y en mayores niveles de expresión de *AGL19*. En el caso del alelo

*agl19-1* es posible que el T-DNA esté afectando la expresión de *AGL19* por otro mecanismo diferente a las modificaciones postraduccionales de histonas, por ejemplo, al alterar los patrones de metilación del DNA, o modificando la estructura tridimensional de la cromatina de la región donde fue insertado y de esta forma podría “relajar” la cromatina causando un ambiente eucromático, sin modificar los patrones de H3K27me3 sobre el locus de *AGL19*, lo cual se podría traducir en los niveles de expresión que se observan en los ensayos de RT-PCR (Figura 6A). En el caso del tercer alelo, *agl19-3*, se observa un mayor enriquecimiento de H3K27me3 con respecto al WT y a los otros dos alelos. Aunque esta inserción se encuentra en el cuarto intrón de *AGL19*, parece ser que el T-DNA insertado está promoviendo un mayor posicionamiento de la marca epigenética H3K27me3 sobre la región 5' de *AGL19*. Al igual que con el alelo *agl19-1* es posible que la inserción de T-DNA de *agl19-3* modifique la estructura tridimensional del locus de *AGL19*, pero en este caso particular podría estar formando un asa de cromatina represiva que está actuando para inhibir la acumulación de *AGL19* al promover un mayor enriquecimiento de H3K27me3 en la región 5' de *AGL19* (en los ensayos de RT-PCR y RT-qPCR este alelo es el que presenta una acumulación prácticamente nula).

Un estudio bioinformático reciente demostró una relación directa entre el proceso de *splicing* alternativo y el ambiente epigenético en *Arabidopsis* (Ullah et al. 2018). En este estudio se analizaron datos transcriptómicos de *splicing* alternativo y de sitios hipersensibles a la DNasa I (*DNase I Hypersensitive Sites* (DHSs)), los cuales denotan un ambiente de cromatina más relajada. El *splicing* del mRNA sucede de manera co-transcripcional y está

influenciado por la tasa de transcripción, la cual, a su vez depende de la estructura de la cromatina (Naftelberg et al. 2015). En otros modelos eucariontes se tiene evidencia de la relación entre el *splicing* y la cromatina, sin embargo, en *Arabidopsis* no se tenía evidencia de esta relación. En plantas el evento de *splicing* alternativo más común es el de retención de intrones y en el estudio de Ullah, et al. (2018) se demostró que los eventos de retención de intrones se encuentran enriquecidos en DHSs, es decir, un intrón es más fácilmente retenido en un ambiente de eucromatina. Los autores hipotetizan que este fenómeno es debido a una mayor tasa de elongación de la RNAPol II que no permite el reconocimiento de los intrones para ser procesados por la maquinaria del spliceosoma, aunado a la unión de factores de transcripción a estos DHSs, los cuales pueden actuar como represores del proceso de *splicing* (Ullah et al. 2018). Este modelo planteado con base en el análisis de datos genómicos es consistente con nuestras observaciones en el mutante *agl19-2*, donde se tiene un menor enriquecimiento de H3K27me3 en la región 5' de *AGL19*, una marca represiva típica de heterocromatina (ocasionado por la inserción de T-DNA) (Figura 14B), y en donde se observa un mayor enriquecimiento de los transcritos alternativos que retienen intrones (Figura 12). El caso contrario sucede con *agl19-3* donde se observa un mayor enriquecimiento de H3K27me3 y se observa una menor acumulación de los transcritos de *AGL19* (Figuras 6A, 12 y 13). También se sabe que la cromatina de genes cuyos patrones de *splicing* son regulados por la temperatura se encuentra enriquecida en H3K36me3, una marca relacionada con la elongación transcripcional, y la alteración de los niveles de H3K36me3 puede modificar los patrones de *splicing* de estos genes (Pajoro et al. 2017). Este

tipo de evidencias sugieren una estrecha relación entre la estructura de la cromatina y los procesos de *splicing* en plantas.

Nuestros datos muestran que las inserciones de T-DNA pueden resultar en cambios en la abundancia de la marca epigenética H3K27me3, lo cual puede repercutir en la acumulación tanto de *AGL19* como de sus transcritos alternativos. Los resultados de este trabajo sugieren que estos fenómenos deben de considerarse al momento de analizar los fenotipos mutantes generados por inserción de T-DNA, especialmente en genes con patrones complejos de eventos de *splicing* alternativo.

## 8. Conclusiones

Con respecto a los genes regulados por *AGL19* en vernalización, con este trabajo se descubrió que el gen *RING-H2 FINGER A1A (RHA1A; AT4G11370)* se induce por vernalización y es regulado positivamente por *AGL19*. Este gen codifica para una proteína E3 ubiquitín ligasa tipo RING-H2, sin embargo, aún no se ha descrito su papel específico. Así mismo, *AGL19* actúa como un regulador positivo de *FLC* y *XAL2*, y negativo de *SOC1* en condiciones de día corto.

Por otra parte, referente a la regulación de *AGL19* y las diferencias observadas en la acumulación de transcritos de este locus en los diferentes mutantes por inserción de T-DNA, no encontramos una correlación directa entre una mayor acumulación de transcritos alternativos de *AGL19* con el fenotipo observado en el tiempo de floración de los mutantes. En día corto, la abundancia de los transcritos alternativos de *AGL19* analizados aumenta en

los mutantes *agl19-1* y *agl19-2*, pero en las plantas que fueron vernalizadas la abundancia de estos transcritos es similar a la de las plantas WT. En cambio, en *agl19-3* no se observa acumulación del transcrito canónico de *AGL19*. Al analizar la acumulación de los mensajeros que incluyen los intrones 3 y 6 en los tres mutantes, sólo se encontró un incremento de ambos mensajeros en *agl19-2*. Esto sugiere que el fenotipo de floración tardía de estos mutantes podría ser causado por distintos mecanismos los cuales recaen en la alteración de la actividad de la proteína de AGL19.

De forma interesante, encontramos que en plantas crecidas por 40 días en DL las inserciones de T-DNA modifican diferencialmente el enriquecimiento de la marca H3K27me3 sobre la región 5' de *AGL19*, siendo menor en el alelo *agl19-2*, cuya inserción se encuentra en el mismo intrón 1, y mayor en *agl19-3*, que tiene el T-DNA localizado en la región 5' del cuarto intrón, lo que indica que las inserciones de T-DNA pueden afectar la acumulación de esta marca a distancia, al menos en el mismo gen. Esto ayuda a explicar al menos en parte, la acumulación observada en los transcritos de este locus en DL.

## 9. Perspectivas

Tomando en cuenta los datos de RT-qPCR que muestran que no existe una correlación entre el aumento en la acumulación de los transcritos alternativos de *AGL19* y el fenotipo de floración tardía observado en los mutantes *agl19* (Figura 12 y 13), existe la posibilidad de que si estos transcritos alternativos en efecto tienen una función, esta será a nivel de proteína. Anteriormente se realizó una predicción en la que se observó que en caso de que estos mensajeros se tradujeran se generaría una proteína que tendría los dominios MADS de

unión a DNA y el Intermedio, en el caso de la retención del intrón 3, o casi toda la proteína sin el extremo carboxilo terminal en el caso de la retención del intrón 6, por lo que estas proteínas podrían competir por los mismos blancos de regulación que AGL19 (Yustis, 2018), lo cual explicaría el fenotipo observado a pesar de que no vemos un incremento correlativo en sus niveles de acumulación.

La descripción de fenotipos es una herramienta útil para poder conocer la función de los genes en plantas (Lloyd y Meinke, 2012). La función de las isoformas producto de un *splicing* alternativo de *FLM* conocidas hasta el momento (Posé et al. 2013), así como más recientemente del grupo de genes *MAF2-5* (Theißen, Rümpler, and Gramzow 2018), se descubrieron mediante la utilización de líneas sobreexpresoras de estas isoformas y la descripción de los fenotipos observados en las líneas transgénicas. Debido a estos antecedentes, creemos que generar construcciones sobreexpresoras de los transcritos alternativos de *AGL19* es la alternativa experimental más práctica que nos permitirá conocer si tienen alguna función. Tampoco conocemos el inicio de la transcripción de estos transcritos alternativos, por lo cual es necesario el uso de técnicas como RACE 5' para determinar exactamente dónde comienzan estos transcritos.

El análisis del microarreglo fue una primera aproximación que utilizamos para intentar entender el papel de AGL19 en el proceso de vernalización, así como también para estudiar el proceso de vernalización más allá de lo que se conoce sobre *FLC*. Sin embargo, como se observó en este trabajo, su nivel de sensibilidad no nos permite obtener grupos de genes cuyos cambios en sus niveles de expresión puedan ser validados por RT-qPCR. Aún así,

se descubrió que AGL19 regula de manera positiva a *RHA1A* después de la vernalización. Hasta antes de este trabajo no se tenía evidencia de ningún blanco de regulación de AGL19 en este proceso. Aunado a esto, evidencia más reciente de que otro gen de la familia RING H2, *RHA2B*, tiene un comportamiento similar a VIN3 en vernalización (Xi et al. 2020), apunta a un posible papel de esta familia en este proceso. El estudio de los fenotipos en vernalización de los dobles mutantes *agl19-3 rha1a* y *rha1a rha2b* puede ayudar a entender su papel en este proceso. Otro gen involucrado en la vernalización es *AGL24* y aunque no se encontró su regulación por AGL19, no se puede descartar la posibilidad de que interactúen al nivel de proteína. Análisis del doble mutante *agl19 agl24* puede ser un útil para empezar a estudiar si estos genes actúan de manera conjunta o independiente en el proceso de vernalización. Es importante señalar que AGL19 puede participar en otros procesos del desarrollo de *Arabidopsis* además de la transición a la floración. Otros genes MADS-box, incluidos *AGL24*, *SOC1* y *FLC*, tienen funciones en diversos procesos del desarrollo en *Arabidopsis*. De los genes diferencialmente expresados reportados por Xi et al. (2020), se podría analizar si algunos de esos genes son regulados por o regulan a *AGL19*. Tomando en cuenta los datos de RNA-seq de *AGL19*, *AGL24* y *SOC1*, los cuales muestran que la acumulación de los transcritos de estos genes aumenta con la vernalización y que su expresión se mantiene después de que las plantas regresan a condiciones más cálidas, se podrían analizar algunos genes que presenten este mismo patrón de expresión, ya que es probable que se encuentren genes que tengan funciones en la transición a la floración.

Para poder encontrar genes que sean regulados directamente por AGL19 se podría hacer uso de dos técnicas. El RNA-seq se ha convertido en una piedra angular de los estudios transcriptómicos (Stark, Grzelak, y Hadfield, 2019). Por su parte el DAP-seq (*DNA affinity purification sequencing*) es una técnica que utiliza construcciones traduccionales de factores de transcripción expresados *in vitro* que tienen un marcador (como GFP o MYC) los cuales son capaces de unirse a fragmentos de DNA genómico. El DNA unido a estos factores de transcripción es separado y subsecuentemente eluido y secuenciado. A diferencia de técnicas similares como el ChIP-seq, el DAP-seq es un técnica menos costosa, relativamente sencilla y fácilmente escalable, y se ha demostrado que los resultados obtenidos a partir del DAP-seq tienen una sensibilidad y especificidad muy similares a los del ChIP-seq (Franco-Zorrilla et al. 2014; O'Malley et al. 2016; Bartlett et al. 2017). El análisis cruzado de datos de RNA-seq, los cuales nos permitan saber qué genes se desregulan en un mutante *agl19* y los blancos de unión directa de AGL19 obtenidos a partir del DAP-seq, nos permitirán establecer blancos de regulación directa de AGL19.

## 10. Referencias

- Airoldi, Chiara A., Mary McKay, and Brendan Davies. 2015. "MAF2 Is Regulated by Temperature-Dependent Splicing and Represses Flowering at Low Temperatures in Parallel with FLM." *PLoS ONE* 10 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126516>.
- Alexandre, Cristina, and Lars Hennig. 2007. "FLC-Independent Vernalization Responses." *Developmental Biology* 1 (2): 202–11. [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0712/IJPDB\\_1\(2\)/IJPDB\\_1\(2\)202-211o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/0712/IJPDB_1(2)/IJPDB_1(2)202-211o.pdf).
- Alexandre, Cristina Madeira, and Lars Hennig. 2008. "FLC or Not FLC: The Other Side of Vernalization." *Journal of Experimental Botany* 59 (6): 1127–35. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern070>.
- Aluri, S., and M. Buttner. 2007. "Identification and Functional Expression of the Arabidopsis Thaliana Vacuolar Glucose Transporter 1 and Its Role in Seed Germination and Flowering." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (7): 2537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610278104>.
- Alvarez-Buylla, Elena R, Mariana Benítez, Adriana Corvera-Poiré, Álvaro Chaos Cador, Stefan de Folter, Alicia Gamboa de Buen, Adriana Garay-Arroyo, et al. 2010. "Flower Development." In *The Arabidopsis Book - American Society of Plant Biologists*, 8:1–57. <https://doi.org/10.1199/tab.0127>.
- Amasino, Richard. 2010. "Seasonal and Developmental Timing of Flowering." *Plant Journal* 61 (6): 1001–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x>.
- Araki, Takashi. 2001. "Transition from Vegetative to Reproductive Phase." *Current Opinion in Plant Biology* 4 (1): 63–68. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00137-0).
- Bartlett, Anna, Ronan C. O'Malley, Shao Shan Carol Huang, Mary Galli, Joseph R. Nery, Andrea Gallavotti, and Joseph R. Ecker. 2017. "Mapping Genome-Wide Transcription-Factor Binding Sites Using DAP-Seq." *Nature Protocols* 12 (8): 1659–72. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.055>.
- Bastow, Ruth, Joshua S Mylne, Clare Lister, Zachary Lippman, Robert a Martienssen, and Caroline Dean. 2004. "Vernalization Requires Epigenetic Silencing of FLC by Histone Methylation." *Nature* 427 (6970): 164–67. <https://doi.org/10.1038/nature02269>.
- Baulcombe, David C., and Caroline Dean. 2014. "Epigenetic Regulation in Plant Responses to the Environment." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (9): a019471. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019471>.
- Biel, Alecia, Morgan Moser, and Iris Meier. 2020. "A Role for Plant KASH Proteins in Regulating Stomatal Dynamics." *Plant Physiology* 182 (2): 1100–1113. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01010>.

- Blair, Logan, Gabriela Auge, and Kathleen Donohue. 2017. "Effect of FLOWERING LOCUS C on Seed Germination Depends on Dormancy." *Functional Plant Biology* 44 (5): 493–506. <https://doi.org/10.1071/FP16368>.
- Blázquez, Miguel A., Cristina Ferrándiz, Francisco Madueño, and François Parcy. 2006. "How Floral Meristems Are Built." *Plant Molecular Biology* 60 (6 SPEC. ISS.): 855–70. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0013-z>.
- Bloomer, R H, and C Dean. 2017. "Fine-Tuning Timing: Natural Variation Informs the Mechanistic Basis of the Switch to Flowering in *Arabidopsis Thaliana*." *Journal of Experimental Botany* 68 (20): 5439–52. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx270>.
- Bouché, Frédéric, Guillaume Lobet, Pierre Tocquin, and Claire Périlleux. 2016. "FLOR-ID: An Interactive Database of Flowering-Time Gene Networks in *Arabidopsis Thaliana*." *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D1167–71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1054>.
- Bratzel, Fabian, and Franziska Turck. 2015. "Molecular Memories in the Regulation of Seasonal Flowering: From Competence to Cessation." *Genome Biology* 16 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0770-6>.
- Bu, Qingyun, Hongmei Li, Qingzhen Zhao, Hongling Jiang, Qingzhe Zhai, Jie Zhang, Xiaoyan Wu, et al. 2009. "The *Arabidopsis* RING Finger E3 Ligase RHA2a Is a Novel Positive Regulator of Abscisic Acid Signaling during Seed Germination and Early Seedling Development." *Plant Physiology* 150 (1): 463–81. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135269>.
- Capovilla, Giovanna, Markus Schmid, and David Posé. 2015. "Control of Flowering by Ambient Temperature." *Journal of Experimental Botany* 66 (1): 59–69. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru416>.
- Capovilla, Giovanna, Efthymia Symeonidi, Rui Wu, and Markus Schmid. 2017. "Contribution of Major FLM Isoforms to Temperature-Dependent Flowering in *Arabidopsis Thaliana*." *Journal of Experimental Botany* 68 (18): 5117–27. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx328>.
- Chamala, Srikar, Guanqiao Feng, Carolina Chavarro, and W Brad Barbazuk. 2015. "Genome-Wide Identification of Evolutionarily Conserved Alternative Splicing Events in Flowering Plants." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3 (March): 33. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00033>.
- Chandler, John, Jose M. Martinez-Zapater, and Caroline Dean. 2000. "Mutations Causing Defects in the Biosynthesis and Response to Gibberellins, Abscisic Acid and Phytochrome B Do Not Inhibit Vernalization in *Arabidopsis Fca-1*." *Planta* 210 (4): 677–82. <https://doi.org/10.1007/s004250050059>.
- Cheng, Jing Zhi, Yu Ping Zhou, Tian Xiao Lv, Chu Ping Xie, and Chang En Tian. 2017. "Research Progress on the Autonomous Flowering Time Pathway in *Arabidopsis*." *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23 (3): 477–85. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0458-3>.

- Chiang, George C.K., Deepak Barua, Elena M. Kramera, Richard M. Amasino, and Kathleen Donohue. 2009. "Major Flowering Time Gene, FLOWERING LOCUS C, Regulates Seed Germination in Arabidopsis Thaliana." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (28): 11661–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901367106>.
- Choi, K., J. Kim, H.J. Hwang, S.Y. Kim, C. Park, S.Y. Kim, and I. Lee. 2011. "The FRIGIDA Complex Activates Transcription of FLC, a Strong Flowering Repressor in Arabidopsis, by Recruiting Chromatin Modification Factors." *Plant Cell* 23 (1): 289–303. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075911>.
- Conn, Vanessa M., Véronique Hugouvieux, Aditya Nayak, Stephanie A. Conos, Giovanna Capovilla, Gökhan Cildir, Agnès Jourdain, et al. 2017. "A CircRNA from SEPALLATA3 Regulates Splicing of Its Cognate MRNA through R-Loop Formation." *Nature Plants* 3 (5): 1–5. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.53>.
- Crevillén, Pedro, Cagla Sonmez, Zhe Wu, and Caroline Dean. 2013. "A Gene Loop Containing the Floral Repressor FLC Is Disrupted in the Early Phase of Vernalization." *EMBO Journal* 32 (1): 140–48. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.324>.
- Csorba, Tibor, Julia I Questa, Qianwen Sun, and Caroline Dean. 2014. "Antisense COOLAIR Mediates the Coordinated Switching of Chromatin States at FLC during Vernalization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (45): 16160–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419030111>.
- Dai, Yiming, Wenli Li, and Lijia An. 2016. "NMD Mechanism and the Functions of Upf Proteins in Plant." *Plant Cell Reports*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1867-9>.
- Davière, Jean Michel, and Patrick Achard. 2013. "Gibberellin Signaling in Plants." *Development (Cambridge)* 140 (6): 1147–51. <https://doi.org/10.1242/dev.087650>.
- Deng, Weiwei, Hua Ying, Chris A. Helliwell, Jennifer M. Taylor, W. James Peacock, and Elizabeth S. Dennis. 2011. "FLOWERING LOCUS C (FLC) Regulates Development Pathways throughout the Life Cycle of Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (16): 6680–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103175108>.
- Derkacheva, Maria, Yvonne Steinbach, Thomas Wildhaber, Iva Mozgová, Walid Mahrez, Paolo Nanni, Sylvain Bischof, Wilhelm Grisse, and Lars Hennig. 2013. "Arabidopsis MSI1 Connects LHP1 to PRC2 Complexes." *The EMBO Journal* 5 (14): 1–13. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.145>.
- Desvoyes, Bénédicte, Zaida Vergara, Joana Sequeira-Mendes, Sofia Madeira, and Crisanto Gutierrez. 2018. "A Rapid and Efficient ChIP Protocol to Profile Chromatin Binding Proteins and Epigenetic Modifications in Arabidopsis." *Methods in Molecular Biology* 1675: 71–82. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7318-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7318-7_5).

- Deyholos, M. K., and L. E. Sieburth. 2000. "Separable Whorl-Specific Expression and Negative Regulation by Enhancer Elements within the AGAMOUS Second Intron." *Plant Cell* 12 (10): 1799–1810. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.10.1799>.
- Ding, Lei, Sang Yeol Kim, and Scott D. Michaels. 2013. "FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR Family Proteins Regulate FLOWERING LOCUS C Expression in Both Winter-Annual and Rapid-Cycling Arabidopsis." *Plant Physiology* 163 (1): 243–52. <https://doi.org/10.1104/pp.113.223958>.
- Dorca-Fornell, Carmen, Veronica Gregis, Valentina Grandi, George Coupland, Lucia Colombo, and Martin M. Kater. 2011. "The Arabidopsis SOC1-like Genes AGL42, AGL71 and AGL72 Promote Flowering in the Shoot Apical and Axillary Meristems." *Plant Journal* 67 (6): 1006–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04653.x>.
- Drechsel, G., A. Kahles, A. K. Kesarwani, E. Stauffer, J. Behr, P. Drewe, G. Ratsch, and A. Wachter. 2013. "Nonsense-Mediated Decay of Alternative Precursor mRNA Splicing Variants Is a Major Determinant of the Arabidopsis Steady State Transcriptome." *The Plant Cell* 25 (10): 3726–42. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115485>.
- Ferrándiz, Cristina, Qing Gu, Robert Martienssen, and Martin F. Yanofsky. 2000. "Redundant Regulation of Meristem Identity and Plant Architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER." *Development* 127 (4): 725–34.
- Folter, Stefan de, and Gerco C. Angenent. 2006. "Trans Meets Cis in MADS Science." *Trends in Plant Science*. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.008>.
- Folter, Stefan De, Richard G.H. Immink, Martin Kieffer, Lucie Pařenicová, Stefan R. Henz, Detlef Weigel, Marco Busscher, et al. 2005. "Comprehensive Interaction Map of the Arabidopsis MADS Box Transcription Factors." *Plant Cell* 17 (5): 1424–33. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031831>.
- Fornara, Fabio, Amaury de Montaigu, and George Coupland. 2010. "SnapShot: Control of Flowering in Arabidopsis." *Cell* 141 (3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.024>.
- Franco-Zorrilla, José M., Irene López-Vidriero, José L. Carrasco, Marta Godoy, Pablo Vera, and Roberto Solano. 2014. "DNA-Binding Specificities of Plant Transcription Factors and Their Potential to Define Target Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (6): 2367–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316278111>.
- Gazzani, Silvia, Anthony R. Gendall, Clare Lister, and Caroline Dean. 2003. "Analysis of the Molecular Basis of Flowering Time Variation in Arabidopsis Accessions." *Plant Physiology* 132 (2): 1107–14. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021212>.

- Gelvin, Stanton B., and Sang Ic Kim. 2007. "Effect of Chromatin upon Agrobacterium T-DNA Integration and Transgene Expression." *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1769 (5–6): 410–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.04.005>.
- Gramzow, Lydia, and Guenter Theissen. 2010. "A Hitchhiker's Guide to the MADS World of Plants." *Genome Biology* 11 (6): 214. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-6-214>.
- Gramzow, Lydia, and Günter Theißen. 2015. "Phylogenomics Reveals Surprising Sets of Essential and Dispensable Clades of MIKCC-Group MADS-Box Genes in Flowering Plants." *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 324 (4): 353–62. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22598>.
- Gregis, Veronica, Alice Sessa, Lucia Colombo, and Martin M. Kater. 2008. "AGAMOUS-LIKE24 and SHORT VEGETATIVE PHASE Determine Floral Meristem Identity in Arabidopsis." *Plant Journal* 56 (6): 891–902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03648.x>.
- Gu, Xiaofeng, Chau Le, Yizhong Wang, Zicong Li, Danhua Jiang, Yuqi Wang, and Yuehui He. 2013. "Arabidopsis FLC Clade Members Form Flowering-Repressor Complexes Coordinating Responses to Endogenous and Environmental Cues." *Nature Communications* 4 (1): 1947. <https://doi.org/10.1038/ncomms2947>.
- Hawkes, Emily J., Scott P. Hennelly, Irina V. Novikova, Judith A. Irwin, Caroline Dean, and Karissa Y. Sanbonmatsu. 2016. "COOLAIR Antisense RNAs Form Evolutionarily Conserved Elaborate Secondary Structures." *Cell Reports* 16 (12): 3087–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.045>.
- Helliwell, Chris A., Craig C. Wood, Masumi Robertson, W. James Peacock, and Elizabeth S. Dennis. 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 Journal* 46 (2): 183–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02686.x>.
- Henderson, Ian R, and Caroline Dean. 2004. "Control of Arabidopsis Flowering: The Chill before the Bloom." *Development (Cambridge, England)* 131 (16): 3829–38. <https://doi.org/10.1242/dev.01294>.
- Heo, Jae Bok, and Sibum Sung. 2010. "Vernalization-Mediated Epigenetic Silencing by a Long Intronic Noncoding RNA." *Science* 76 (2011): 10.1126/science.1197349. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>.
- Hillman, R Tyler, Richard E Green, and Steven E Brenner. 2004. "An Unappreciated Role for RNA Surveillance." *Genome Biology* 5 (2): R8. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-2-r8>.
- Hong, Ray L., Lynn Hamaguchi, Maximilian A. Busch, and Detlef Weigel. 2003. "Regulatory Elements of the Floral Homeotic Gene AGAMOUS Identified by Phylogenetic Footprinting and Shadowing." *Plant Cell* 15 (6):

- 1296–1309. <https://doi.org/10.1105/tpc.009548>.
- Hubé, Florent, and Claire Francastel. 2018. “Coding and Non-Coding RNAs, the Frontier Has Never Been so Blurred.” *Frontiers in Genetics* 9 (APR): 140. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00140>.
- Hussain, Tajammul, Nazia Rehman, Safeena Inam, Wajya Ajmal, Amber Afroz, Aish Muhammad, Yusuf Zafar, Ghulam Muhammad Ali, and Muhammad Ramzan Khan. 2019. “Homotypic Clusters of Transcription Factor Binding Sites in the First Large Intron of AGL24 MADS-Box Transcription Factor Are Recruited in the Enhancement of Floral Expression.” *Plant Molecular Biology Reporter* 37 (1–2): 24–40. <https://doi.org/10.1007/s11105-019-01136-7>.
- Jang, Seonghoe, Virginie Marchal, Kishore C.S. Panigrahi, Stephan Wenkel, Wim Soppe, Xing Wang Deng, Federico Valverde, and George Coupland. 2008. “Arabidopsis COP1 Shapes the Temporal Pattern of CO Accumulation Conferring a Photoperiodic Flowering Response.” *EMBO Journal* 27 (8): 1277–88. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.68>.
- Jia, Xiaoyan, Bidisha Chanda, Mingzhe Zhao, Amy M. Brunner, and Eric P. Beers. 2015. “Instability of the Arabidopsis Mutant Csn5a-2 Caused by Epigenetic Modification of Intronic T-DNA.” *Plant Science* 238 (September): 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.015>.
- Jiang, Danhua, and Frédéric Berger. 2017. “DNA Replication–Coupled Histone Modification Maintains Polycomb Gene Silencing in Plants.” *Science* 357 (6356): 1146–49. <https://doi.org/10.1126/science.aan4965>.
- Jiang, Jiming. 2015. “The ‘dark Matter’ in the Plant Genomes: Non-Coding and Unannotated DNA Sequences Associated with Open Chromatin.” *Current Opinion in Plant Biology* 24: 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.01.005>.
- Jung, Jae Hoon, Yun Ju, Pil Joon Seo, Jae Hyung Lee, and Chung Mo Park. 2012. “The SOC1-SPL Module Integrates Photoperiod and Gibberellic Acid Signals to Control Flowering Time in Arabidopsis.” *Plant Journal* 69 (4): 577–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04813.x>.
- Jung, Jae Hoon, Ju Hyung Park, Sangmin Lee, Taiko Kim To, Jong Myong Kim, Motoaki Seki, and Chung Mo Park. 2013. “The Cold Signaling Attenuator HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1 Activates FLOWERING LOCUS C Transcription via Chromatin Remodeling under Short-Term Cold Stress in Arabidopsis.” *Plant Cell* 25 (11): 4378–90. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118364>.
- Jupe, Florian, Angeline C. Rivkin, Todd P. Michael, Mark Zander, S. Timothy Motley, Justin P. Sandoval, R. Keith Slotkin, et al. 2019. “The Complex Architecture and Epigenomic Impact of Plant T-DNA Insertions.” Edited by Jeremy Schmutz. *PLOS Genetics* 15 (1): e1007819. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007819>.
- Kalyna, Maria, Craig G. Simpson, Naeem H. Syed, Dominika Lewandowska, Yamile Marquez, Branislav Kusenda,

- Jacqueline Marshall, et al. 2012. "Alternative Splicing and Nonsense-Mediated Decay Modulate Expression of Important Regulatory Genes in Arabidopsis." *Nucleic Acids Research* 40 (6): 2454–69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr932>.
- Kang, Min Jeong, Hong Shi Jin, Yoo Sun Noh, and Bosl Noh. 2015. "Repression of Flowering under a Noninductive Photoperiod by the HDA9-AGL19-FT Module in Arabidopsis." *New Phytologist* 206 (1): 281–94. <https://doi.org/10.1111/nph.13161>.
- Kim, Dong-hwan H, and Sibum Sung. 2014. "Polycomb-Mediated Gene Silencing in Arabidopsis Thaliana." *Molecules and Cells* 37 (12): 841–50. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0249>.
- Kim, Dong Hwan, and Sibum Sung. 2017. "Vernalization-Triggered Intragenic Chromatin Loop Formation by Long Noncoding RNAs." *Developmental Cell* 40 (3): 302-312.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.12.021>.
- Kim, Dong Hwan, Yanpeng Xi, and Sibum Sung. 2017. "Modular Function of Long Noncoding RNA, COLDAIR, in the Vernalization Response." Edited by Richard M. Amasino. *PLoS Genetics* 13 (7): e1006939. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006939>.
- Kim, Wanhui, David Latrasse, Caroline Servet, and Dao Xiu Zhou. 2013. "Arabidopsis Histone Deacetylase HDA9 Regulates Flowering Time through Repression of AGL19." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 432 (2): 394–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.102>.
- Kimura, Yuriko, Saya Aoki, Eigo Ando, Ayaka Kitatsuji, Aiko Watanabe, Masato Ohnishi, Koji Takahashi, et al. 2015. "A Flowering Integrator, SOC1, Affects Stomatal Opening in Arabidopsis Thaliana." *Plant and Cell Physiology* 56 (4): 640–49. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu214>.
- Kooiker, Maarten, Chiara A. Airoidi, Alessia Losa, Priscilla S. Manzotti, Laura Finzi, Martin M. Kater, and Lucia Colombo. 2005. "Basic Pentacysteine1, a GA Binding Protein That Induces Conformational Changes in the Regulatory Region of the Homeotic Arabidopsis Gene Seedstick." *Plant Cell* 17 (3): 722–29. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.030130>.
- Koorneef, M., C. Alonso-Blanco, H. Blankestijn-De Vries, C. J. Hanhart, and A. J.M. Peeters. 1998. "Genetic Interactions among Late-Flowering Mutants of Arabidopsis." *Genetics* 148 (2): 885–92.
- Koorneef, M., C. J. Hanhart, and J. H. van der Veen. 1991. "A Genetic and Physiological Analysis of Late Flowering Mutants in Arabidopsis Thaliana." *MGG Molecular & General Genetics* 229 (1): 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF00264213>.
- Kumar, S. Vinod, Doris Lucyshyn, Katja E. Jaeger, Enriqueta Alós, Elizabeth Alvey, Nicholas P. Harberd, and Philip a. Wigge. 2012. "Transcription Factor PIF4 Controls the Thermosensory Activation of Flowering." *Nature*

- 484 (7393): 242–45. <https://doi.org/10.1038/nature10928>.
- Kumar, S. Vinod, and Philip A. Wigge. 2010. “H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis.” *Cell* 140 (1): 136–47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.006>.
- Lai, Xuelei, Hussein Daher, Antonin Galien, Veronique Hugouvieux, and Chloe Zubieta. 2019. “Structural Basis for Plant MADS Transcription Factor Oligomerization.” *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.014>.
- Laubinger, Sascha, Virginie Marchal, José Gentillhomme, Stephan Wenkel, Jessika Adrian, Seonghoe Jang, Carmen Kulajta, Helen Braun, George Coupland, and Ute Hoecker. 2006. “Arabidopsis SPA Proteins Regulate Photoperiodic Flowering and Interact with the Floral Inducer CONSTANS to Regulate Its Stability.” *Development* 133 (16): 3213–22. <https://doi.org/10.1242/dev.02481>.
- Lechner, Esther, Pierre Goloubinoff, Pascal Genschik, and Wen Hui Shen. 2002. “A Gene Trap Dissociation Insertion Line, Associated with a RING-H2 Finger Gene, Shows Tissue Specific and Developmental Regulated Expression of the Gene in Arabidopsis.” *Gene* 290 (1–2): 63–71. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00556-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00556-5).
- Lee, Jeong Hwan, Hak Seung Ryu, Kyung Sook Chung, David Posé, Soonkap Kim, Markus Schmid, and Ji Hoon Ahn. 2013. “Regulation of Temperature-Responsive Flowering by MADS-Box Transcription Factor Repressors.” *Science* 342 (6158): 628–32. <https://doi.org/10.1126/science.1241097>.
- Lee, Jungeun, and Ilha Lee. 2010. “Regulation and Function of SOC1, a Flowering Pathway Integrator.” *Journal of Experimental Botany* 61 (9): 2247–54. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq098>.
- Lee, Jungeun, Mijin Oh, Hanna Park, and Ilha Lee. 2008. “SOC1 Translocated to the Nucleus by Interaction with AGL24 Directly Regulates LEAFY.” *Plant Journal* 55 (5): 832–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03552.x>.
- Lempe, Janne, Sureshkumar Balasubramanian, Sridevi Sureshkumar, Anandita Singh, Markus Schmid, and Detlef Weigel. 2005. “Diversity of Flowering Responses in Wild Arabidopsis Thaliana Strains.” *PLoS Genetics* 1 (1): 0109–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010006>.
- Li, Hongmei, Hongling Jiang, Qingyun Bu, Qingzhen Zhao, Jiaqiang Sun, Q. Xie, and Chuanyou Li. 2011. “The Arabidopsis RING Finger E3 Ligase RHA2b Acts Additively with RHA2a in Regulating Abscisic Acid Signaling and Drought Response.” *Plant Physiology* 156 (2): 550–63. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176214>.
- Li, Li, Xu Li, Yawen Liu, and Hongtao Liu. 2016. “Flowering Responses to Light and Temperature.” *Science China Life Sciences* 59 (4): 403–8. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4910-8>.
- Li, Mingzhe, Fengying An, Wenyang Li, Mengdi Ma, Ying Feng, Xing Zhang, and Hongwei Guo. 2016. “DELLA

- Proteins Interact with FLC to Repress Flowering Transition." *Journal of Integrative Plant Biology* 58 (7): 642–55. <https://doi.org/10.1111/jipb.12451>.
- Li, Zicong, Danhua Jiang, and Yuehui He. 2018. "FRIGIDA Establishes a Local Chromosomal Environment for FLOWERING LOCUS C MRNA Production." *Nature Plants* 4 (10): 836–46. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0250-6>.
- Liu, C., J. Zhou, K. Bracha-Drori, S. Yalovsky, T. Ito, and H. Yu. 2007. "Specification of Arabidopsis Floral Meristem Identity by Repression of Flowering Time Genes." *Development* 134 (10): 1901–10. <https://doi.org/10.1242/dev.003103>.
- Liu, Fuquan, Sebastian Marquardt, Clare Lister, Szymon Swiezewski, and Caroline Dean. 2010. "Targeted 3' Processing of Antisense Transcripts Triggers Arabidopsis FLC Chromatin Silencing." *Science* 327 (5961): 94–97. <https://doi.org/10.1126/science.1180278>.
- Liu, Fuquan, Victor Quesada, Pedro Crevillén, Isabel Bäurle, Szymon Swiezewski, and Caroline Dean. 2007. "The Arabidopsis RNA-Binding Protein FCA Requires a Lysine-Specific Demethylase 1 Homolog to Downregulate FLC." *Molecular Cell* 28 (3): 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.018>.
- Liu, Jiayou, Sarah J. Gilmour, Michael F. Thomashow, and Steven Van Nocker. 2002. "Cold Signalling Associated with Vernalization in Arabidopsis Thaliana Does Not Involve CBF1 or Abscisic Acid." *Physiologia Plantarum* 114 (1): 125–34. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140117.x>.
- Liu, Li Jun, Yan Chun Zhang, Qing Hua Li, Yi Sang, Jian Mao, Hong Li Lian, Long Wang, and Hong Quan Yang. 2008. "COP1-Mediated Ubiquitination of CONSTANS Is Implicated in Cryptochrome Regulation of Flowering in Arabidopsis." *Plant Cell* 20 (2): 292–306. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057281>.
- Lloyd, Johnny, and David Meinke. 2012. "A Comprehensive Dataset of Genes with a Loss-of-Function Mutant Phenotype in Arabidopsis." *Plant Physiology* 158 (3): 1115–29. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192393>.
- Longevialle, Andéol Falcon De, Etienne H. Meyer, Charles Andrés, Nicolas L. Taylor, Claire Lurin, A. Harvey Millar, and Ian D. Small. 2007. "The Pentatricopeptide Repeat Gene OTP43 Is Required for Trans-Splicing of the Mitochondrial Nad1 Intron 1 in Arabidopsis Thaliana." *Plant Cell* 19 (10): 3256–65. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054841>.
- Lucia, F De, P Crevillen, A M Jones, T Greb, and C Dean. 2008. "A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 Triggers the Epigenetic Silencing of FLC during Vernalization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (44): 16831–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808687105>.
- Luo, Xiao, and Yuehui He. 2020. "Experiencing Winter for Spring Flowering: A Molecular Epigenetic Perspective on Vernalization." *Journal of Integrative Plant Biology*. Blackwell Publishing Ltd.

<https://doi.org/10.1111/jipb.12896>.

Marquardt, Sebastian, Oleg Raitskin, Zhe Wu, Fuquan Liu, Qianwen Sun, and Caroline Dean. 2014. "Functional Consequences of Splicing of the Antisense Transcript COOLAIR on FLC Transcription." *Molecular Cell* 54 (1): 156–65. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.026>.

Martinez-Castilla, León Patricio, and Elena R Alvarez-Buylla. 2003. "Adaptive Evolution in the Arabidopsis MADS-Box Gene Family Inferred from Its Complete Resolved Phylogeny." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (23): 13407–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1835864100>.

McGlinchy, Nicholas J., and C. W J Smith. 2008. "Alternative Splicing Resulting in Nonsense-Mediated mRNA Decay: What Is the Meaning of Nonsense?" *Trends in Biochemical Sciences* 33 (8): 385–93. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.06.001>.

Mendes, Marta Adelina, Rosalinda Fiorella Guerra, Markus Christian Berns, Carlo Manzo, Simona Masiero, Laura Finzi, Martin M. Kater, and Lucia Colombo. 2013. "MADS Domain Transcription Factors Mediate Short-Range DNA Looping That Is Essential for Target Gene Expression in Arabidopsis." *Plant Cell* 25 (7): 2560–72. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.108688>.

Meng, Xianwen, Xue Li, Peijing Zhang, Jingjing Wang, Yincong Zhou, and Ming Chen. 2017. "Circular RNA: An Emerging Key Player in RNA World." *Briefings in Bioinformatics* 18 (4): 547–57. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw045>.

Michaels, S D, and R M Amasino. 1999. "FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering." *The Plant Cell* 11 (5): 949–56. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.949>.

Michaels, Scott., Gary Ditta, Cindy Gustafson-Brown, Soraya Pelaz, Martin Yanofsky, and Richard M. Amasino. 2003. "AGL24 Acts as a Promoter of Flowering in Arabidopsis and Is Positively Regulated by Vernalization." *Plant Journal* 33 (5): 867–74. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01671.x>.

Mizoguchi, Tsuyoshi, Louisa Wright, Sumire Fujiwara, Frédéric Cremer, Karen Lee, Hitoshi Onouchi, Aidyn Mouradov, et al. 2005. "Distinct Roles of GIGANTEA in Promoting Flowering and Regulating Circadian Rhythms in Arabidopsis." *Plant Cell* 17 (8): 2255–70. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033464>.

Mozgova, Iva, and Lars Hennig. 2015. "The Polycomb Group Protein Regulatory Network." *Annual Review of Plant Biology* 66 (1): 269–96. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115627>.

Mutasa-Göttgens, Effie, and Peter Hedden. 2009. "Gibberellin as a Factor in Floral Regulatory Networks." *Journal of Experimental Botany* 60 (7): 1979–89. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp040>.

Naftelberg, Shiran, Ignacio E. Schor, Gil Ast, and Alberto R. Kornblihtt. 2015. "Regulation of Alternative Splicing

- Through Coupling with Transcription and Chromatin Structure." *Annual Review of Biochemistry* 84 (1): 165–98. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034242>.
- Nasim, Zeeshan, Muhammad Fahim, and Ji Hoon Ahn. 2017. "Possible Role of MADS AFFECTING FLOWERING 3 and B-BOX DOMAIN PROTEIN 19 in Flowering Time Regulation of Arabidopsis Mutants with Defects in Nonsense-Mediated mRNA Decay." *Frontiers in Plant Science* 8: 191. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00191>.
- O'Malley, Ronan C., Shao shan Carol Huang, Liang Song, Mathew G. Lewsey, Anna Bartlett, Joseph R. Nery, Mary Galli, Andrea Gallavotti, and Joseph R. Ecker. 2016. "Erratum: Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape (Cell (2016) 165(5) (1280–1292))." *Cell* 166 (6): 1598. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.063>.
- Osabe, Kenji, Yoshiko Harukawa, Saori Miura, and Hidetoshi Saze. 2017. "Epigenetic Regulation of Intronic Transgenes in Arabidopsis." *Scientific Reports* 7: 45166. <https://doi.org/10.1038/srep45166>.
- Pajoro, A., E. Severing, G. C. Angenent, and R. G. H. Immink. 2017. "Histone H3 Lysine 36 Methylation Affects Temperature-Induced Alternative Splicing and Flowering in Plants." *Genome Biology* 18 (1): 102. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1235-x>.
- Pařenicová, Lucie, Stefan De Folter, Martin Kieffer, David S. Horner, Cristina Favalli, Jacqueline Busscher, Holly E. Cook, et al. 2003. "Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World." *Plant Cell* 15 (7): 1538–51. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>.
- Parenicová, Lucie, Stefan de Folter, Martin Kieffer, David S Horner, Cristina Favalli, Jacqueline Busscher, Holly E Cook, et al. 2003. "Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World." *The Plant Cell* 15 (7): 1538–51. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>.
- Pastore, J. J., A. Limpuangthip, N. Yamaguchi, M.-F. Wu, Y. Sang, S.-K. Han, L. Malaspina, N. Chavdaroff, A. Yamaguchi, and D. Wagner. 2011. "LATE MERISTEM IDENTITY2 Acts Together with LEAFY to Activate APETALA1." *Development* 138 (15): 3189–98. <https://doi.org/10.1242/dev.063073>.
- Pérez-Ruiz, Rigoberto V., Berenice García-Ponce, Nayelli Marsch-Martínez, Yamel Ugartechea-Chirino, Mitzi Villajuana-Bonequi, Stefan De Folter, Eugenio Azpeitia, et al. 2015. "XAANTAL2 (AGL14) Is an Important Component of the Complex Gene Regulatory Network That Underlies Arabidopsis Shoot Apical Meristem Transitions." *Molecular Plant* 8 (5): 796–813. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.017>.
- Pin, P. A., and O. Nilsson. 2012. "The Multifaceted Roles of FLOWERING LOCUS T in Plant Development." *Plant*,

- Cell and Environment* 35 (10): 1742–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02558.x>.
- Poethig, R. Scott. 1990. "Phase Change and the Regulation of Shoot Morphogenesis in Plants." *Science* 250 (4983): 923–30. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.923>.
- Ponnu, Jathish, Vanessa Wahl, and Markus Schmid. 2011. "Trehalose-6-Phosphate: Connecting Plant Metabolism and Development." *Frontiers in Plant Science* 2 (NOV): 70. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00070>.
- Posé, David, Leonie Verhage, Felix Ott, Levi Yant, Johannes Mathieu, Gerco C Angenent, Richard G H Immink, and Markus Schmid. 2013. "Temperature-Dependent Regulation of Flowering by Antagonistic FLM Variants." *Nature* 503 (7476): 414–17. <https://doi.org/10.1038/nature12633>.
- Qi, Hao Dong, Yi Lin, Qiu Ping Ren, Yu Yi Wang, Feng Xiong, and Xiu Ling Wang. 2019. "RNA Splicing of FLC Modulates the Transition to Flowering." *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01625>.
- Qüesta, Julia I., Jie Song, Nuno Geraldo, Hailong An, and Caroline Dean. 2016. "Arabidopsis Transcriptional Repressor VAL1 Triggers Polycomb Silencing at FLC during Vernalization." *Science* 353 (6298): 485–88. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7354>.
- Rijpkema, Anneke S., Tom Gerats, and Michiel Vandenbussche. 2007. "Evolutionary Complexity of MADS Complexes." *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.11.010>.
- Rosa, Stefanie, Susan Duncan, and Caroline Dean. 2016. "Mutually Exclusive Sense–Antisense Transcription at FLC Facilitates Environmentally Induced Gene Repression." *Nature Communications* 7 (October): 13031. <https://doi.org/10.1038/ncomms13031>.
- Rosloski, Sarah Marie, Anandita Singh, Sathya Sheela Jali, Sureshkumar Balasubramanian, Detlef Weigel, and Vojislava Grbic. 2013. "Functional Analysis of Splice Variant Expression of MADS AFFECTING FLOWERING 2 of Arabidopsis Thaliana." *Plant Molecular Biology* 81 (1–2): 57–69. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9982-2>.
- Saddic, Louis A, Bärbel Huvermann, Staver Bezhani, Yanhui Su, Cara M Winter, Chang Seob Kwon, Richard P Collum, and Doris Wagner. 2006. "The LEAFY Target LMI1 Is a Meristem Identity Regulator and Acts Together with LEAFY to Regulate Expression of CAULIFLOWER." *Development* 133 (9): 1673–82. <https://doi.org/10.1242/dev.02331>.
- Saedler, H, A Becker, K U Winter, C Kirchner, and G Theissen. 2001. "MADS-Box Genes Are Involved in Floral Development and Evolution." *Acta Biochimica Polonica* 48 (2): 351–58.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732606>.

- Sandhu, Kulbir Singh, Pushpa Sharma Koirala, and Michael M. Neff. 2013. "The Ben1-1 Brassinosteroid-Catabolism Mutation Is Unstable Due to Epigenetic Modifications of the Intronic T-DNA Insertion." *G3:Genes, Genomes, Genetics* 3 (9): 1587–95. <https://doi.org/10.1534/g3.113.006353>.
- Schauer, Stephen E., Philipp M. Schlüter, Ramarmurthy Baskar, Jacqueline Gheyselinck, Arturo Bolaños, Mark D. Curtis, and Ueli Grossniklaus. 2009. "Intronic Regulatory Elements Determine the Divergent Expression Patterns of Agamous-Like6 Subfamily Members in Arabidopsis." *Plant Journal* 59 (6): 987–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03928.x>.
- Schönrock, Nicole, Romaric Bouveret, Olivier Leroy, Lorenzo Borghi, Claudia Köhler, Wilhelm Grissem, and Lars Hennig. 2006. "Polycomb-Group Proteins Repress the Floral Activator AGL19 in the FLC-Independent Vernalization Pathway." *Genes and Development* 20 (12): 1667–78. <https://doi.org/10.1101/gad.377206>.
- Shaul, Orit. 2015. "Unique Aspects of Plant Nonsense-Mediated mRNA Decay." *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.011>.
- Sheldon, Candice C, Anna B Conn, Elizabeth S Dennis, and W James Peacock. 2002. "Different Regulatory Regions Are Required for the Vernalization-Induced Repression of FLOWERING LOCUS C and for the Epigenetic Maintenance of Repression." *The Plant Cell* 14 (10): 2527–37. <https://doi.org/10.1105/tpc.004564>.
- Shindo, Chikako, Maria Jose Aranzana, Clare Lister, Catherine Baxter, Colin Nicholls, Magnus Nordborg, and Caroline Dean. 2005. "Role of FRIGIDA and FLOWERING LOCUS C in Determining Variation in Flowering Time of Arabidopsis." *Plant Physiology* 138 (June): 1163–73. <https://doi.org/10.1104/pp.105.061309.1>.
- Sieburth, Leslie E., and Elliot M. Meyerowitz. 1997. "Molecular Dissection of the AGAMOUS Control Region Shows That Cis Elements for Spatial Regulation Are Located Intragenically." *Plant Cell* 9 (3): 355–65. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.3.355>.
- Smaczniak, C., R. G. H. Immink, G. C. Angenent, and K. Kaufmann. 2012. "Developmental and Evolutionary Diversity of Plant MADS-Domain Factors: Insights from Recent Studies." *Development* 139 (17): 3081–98. <https://doi.org/10.1242/dev.074674>.
- Song, H.-R., J.-D. Song, J.-N. Cho, R. M. Amasino, B. Noh, and Y.-S. Noh. 2009. "The RNA Binding Protein ELF9 Directly Reduces SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 Transcript Levels in Arabidopsis, Possibly via Nonsense-Mediated mRNA Decay." *The Plant Cell* 21 (4): 1195–1211. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064774>.
- Srikanth, Anusha, and Markus Schmid. 2011. "Regulation of Flowering Time: All Roads Lead to Rome." *Cellular*

- and Molecular Life Sciences* 68 (12): 2013–37. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0673-y>.
- Stark, Rory, Marta Grzelak, and James Hadfield. 2019. “RNA Sequencing: The Teenage Years.” *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0150-2>.
- Strange, Amy, Peijin Li, Clare Lister, Jillian Anderson, Norman Warthmann, Chikako Shindo, Judith Irwin, Magnus Nordborg, and Caroline Dean. 2011. “Major-Effect Alleles at Relatively Few Loci Underlie Distinct Vernalization and Flowering Variation in Arabidopsis Accessions.” Edited by Miltos Tsiantis. *PLoS ONE* 6 (5): e19949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019949>.
- Sun, Qianwen, Tibor Csorba, Konstantina Skourti-Stathaki, Nicholas J. Proudfoot, and Caroline Dean. 2013. “R-Loop Stabilization Represses Antisense Transcription at the Arabidopsis FLC Locus.” *Science* 340 (6132): 619–21. <https://doi.org/10.1126/science.1234848>.
- Sureshkumar, Sridevi, Craig Dent, Andrei Seleznev, Celine Tasset, and Sureshkumar Balasubramanian. 2016. “Nonsense-Mediated mRNA Decay Modulates FLM-Dependent Thermosensory Flowering Response in Arabidopsis.” *Nature Plants* 2 (5): 16055. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.55>.
- Swiezewski, Szymon, Fuquan Liu, Andreas Magusin, and Caroline Dean. 2009. “Cold-Induced Silencing by Long Antisense Transcripts of an Arabidopsis Polycomb Target.” *Nature* 462 (7274): 799–802. <https://doi.org/10.1038/nature08618>.
- Syed, Naeem H., Maria Kalyna, Yamile Marquez, Andrea Barta, and John W S Brown. 2012. “Alternative Splicing in Plants - Coming of Age.” *Trends in Plant Science* 17 (10): 616–23. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.06.001>.
- Tapia-López, Rosalinda, Berenice García-Ponce, Joseph G. Dubrovsky, Adriana Garay-Arroyo, Rigoberto V Pérez-Ruíz, Sun-Hyung S.-H. Kim, Francisca Acevedo, et al. 2008. “An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 146 (3): 1182–92. <https://doi.org/10.1104/pp.107.108647>.
- Theißen, Günter, and Lydia Gramzow. 2015. “Structure and Evolution of Plant MADS Domain Transcription Factors.” In *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*, 127–38. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00008-7>.
- Theißen, Günter, Florian Rümpler, and Lydia Gramzow. 2018. “Array of MADS-Box Genes: Facilitator for Rapid Adaptation?” *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.008>.
- Tian, Yongke, Han Zheng, Fei Zhang, Shiliang Wang, Xiaoru Ji, Chao Xu, Yuehui He, and Yong Ding. 2019. “PRC2 Recruitment and H3K27me3 Deposition at FLC Require FCA Binding of COOLAIR.” *Science Advances* 5 (4): eaau7246. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7246>.

- Torti, Stefano, and Fabio Fornara. 2012. "AGL24 Acts in Concert with SOC1 and FUL during Arabidopsis Floral Transition." *Plant Signaling & Behavior* 7 (10): 1251–54. <https://doi.org/10.4161/psb.21552>.
- Ullah, Fahad, Michael Hamilton, Anireddy S.N. Reddy, and Asa Ben-Hur. 2018. "Exploring the Relationship between Intron Retention and Chromatin Accessibility in Plants." *BMC Genomics* 19 (1): 21. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4393-z>.
- Vandesompele, J., Katleen De Preter, Filip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, and Frank Speleman. 2002. "Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes." *Genome Biology* 3 (7): research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Wahl, V, J Ponnu, A Schlereth, S Arrivault, T Langenecker, A Franke, R Feil, J E Lunn, M Stitt, and M Schmid. 2013. "Regulation of Flowering by Trehalose-6-Phosphate Signaling in Arabidopsis Thaliana." *Science* 339 (6120): 704–7. <https://doi.org/10.1126/science.1230406>.
- Wang, Jia Wei, Benjamin Czech, and Detlef Weigel. 2009. "MiR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in Arabidopsis Thaliana." *Cell* 138 (4): 738–49. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.014>.
- Wang, Peter L., Yun Bao, Muh Ching Yee, Steven P. Barrett, Gregory J. Hogan, Mari N. Olsen, José R. Dinneny, Patrick O. Brown, and Julia Salzman. 2014. "Circular RNA Is Expressed across the Eukaryotic Tree of Life." *PLoS ONE* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090859>.
- Wang, Yu-Yi, Feng Xiong, Qiu-Ping Ren, and Xiu-Ling Wang. 2019. "Regulation of Flowering Transition by Alternative Splicing: The Role of the U2 Auxiliary Factor." Edited by Frank Wellmer. *Journal of Experimental Botany*, September. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz416>.
- Wang, Yu, Chang Liu, Daiwen Yang, Hao Yu, and Yih Cherng Liou. 2010. "Pin1At Encoding a Peptidyl-Prolyl Cis/Trans Isomerase Regulates Flowering Time in Arabidopsis." *Molecular Cell* 37 (1): 112–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.020>.
- Willmann, Matthew R., and R. Scott Poethig. 2011. "The Effect of the Floral Repressor FLC on the Timing and Progression of Vegetative Phase Change in Arabidopsis." *Development* 138 (4): 677–85. <https://doi.org/10.1242/dev.057448>.
- Wu, Hui-Wen, Shulin Deng, Haiying Xu, Hui-Zhu Mao, Jun Liu, Qi-Wen Niu, Huan Wang, and Nam-Hai Chua. 2018. "A Noncoding RNA Transcribed from the *AGAMOUS* (*AG*) Second Intron Binds to CURLY LEAF and Represses *AG* Expression in Leaves." *New Phytologist* 219 (4): 1480–91. <https://doi.org/10.1111/nph.15231>.

- Wu, Zhe, Xiaofeng Fang, Danling Zhu, and Caroline Dean. 2020. "Autonomous Pathway: Flowering Locus c Repression through an Antisense-Mediated Chromatin-Silencing Mechanism." *Plant Physiology* 182 (1): 27–37. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01009>.
- Wu, Zhe, Robert Ietswaart, Fuquan Liu, Hongchun Yang, Martin Howard, and Caroline Dean. 2015. "Quantitative Regulation of FLC via Coordinated Transcriptional Initiation and Elongation." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (1): 4–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518369112>.
- . 2016. "Quantitative Regulation of FLC via Coordinated Transcriptional Initiation and Elongation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (1): 218–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518369112>.
- Xi, Yanpeng, Sung Rye Park, Dong Hwan Kim, Eun Deok Kim, and Sibum Sung. 2020. "Transcriptome and Epigenome Analyses of Vernalization in Arabidopsis Thaliana." *Plant Journal*, June, tpj.14817. <https://doi.org/10.1111/tpj.14817>.
- Xiao, Jun, Run Jin, Xiang Yu, Max Shen, John D. Wagner, Armaan Pai, Claire Song, et al. 2017. "Cis and Trans Determinants of Epigenetic Silencing by Polycomb Repressive Complex 2 in Arabidopsis." *Nature Genetics* 49 (10): 1546–52. <https://doi.org/10.1038/ng.3937>.
- Xu, Mingli, Tiejia Hu, Jianfei Zhao, Mee Yeon Park, Keith W. Earley, Gang Wu, Li Yang, and R. Scott Poethig. 2016. "Developmental Functions of MiR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in Arabidopsis Thaliana." Edited by Miltos Tsiantis. *PLoS Genetics* 12 (8): e1006263. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006263>.
- Xu, Weifeng, Guochang Ding, Ken Yokawa, František Baluška, Qian Feng Li, Yinggao Liu, Weiming Shi, Jiansheng Liang, and Jianhua Zhang. 2013. "An Improved Agar-Plate Method for Studying Root Growth and Response of Arabidopsis Thaliana." *Scientific Reports* 3 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep01273>.
- Yang, Hongchun, Scott Berry, Tjelvar S.G. Olsson, Matthew Hartley, Martin Howard, and Caroline Dean. 2017. "Distinct Phases of Polycomb Silencing to Hold Epigenetic Memory of Cold in Arabidopsis." *Science* 357 (6356): 1142–45. <https://doi.org/10.1126/science.aan1121>.
- Ye, Chu Yu, Li Chen, Chen Liu, Qian Hao Zhu, and Longjiang Fan. 2015. "Widespread Noncoding Circular RNAs in Plants." *New Phytologist* 208 (1): 88–95. <https://doi.org/10.1111/nph.13585>.
- Yuan, Wenya, Xiao Luo, Zicong Li, Wannian Yang, Yizhong Wang, Rui Liu, Jiamu Du, and Yuehui He. 2016. "A Cis Cold Memory Element and a Trans Epigenome Reader Mediate Polycomb Silencing of FLC by Vernalization in Arabidopsis." *Nature Genetics* 48 (12): 1527–34. <https://doi.org/10.1038/ng.3712>.
- Zagotta, MT, S Shannon, C Jacobs, and DR Meeks-Wagner. 1992. "Early-Flowering Mutants of Arabidopsis

Thaliana." *Functional Plant Biology* 19 (4): 411. <https://doi.org/10.1071/pp9920411>.

Zeng, Xiaolin, Zheng Gao, Chuan Jiang, Yupeng Yang, Renyi Liu, and Yuehui He. 2020. "HISTONE DEACETYLASE 9 Functions with Polycomb Silencing to Repress FLOWERING LOCUS C Expression." *Plant Physiology*, October, pp.00793.2019. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00793>.

Zhao, Sheng, and Russell D. Fernald. 2005. "Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Journal of Computational Biology* 12 (8): 1047–64. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047>.

## 11. Figuras suplementarias

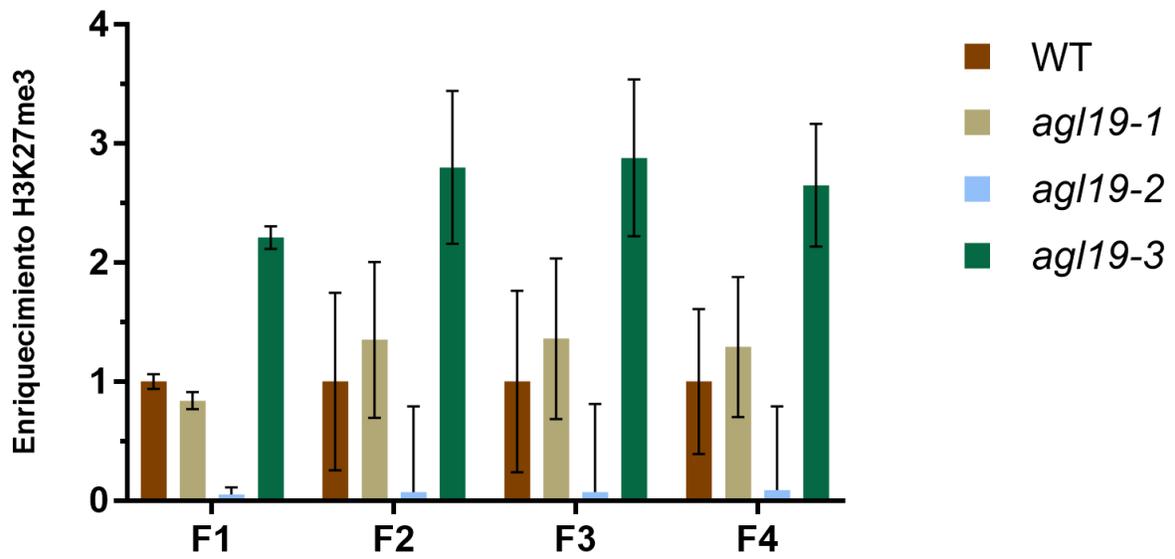


Figura suplementaria 1. Niveles de enriquecimiento sobre el input de H3K27me3 sobre la región 5' de *AGL19*. Segunda réplica biológica del ensayo de ChIP-qPCR observado en la Figura 14.

## 12. Anexo 1: Artículo de difusión “La regulación genética de la floración” realizado durante esta maestría

Comité Editorial: González Andrade, M.; Hernández Alcántara G.; Martínez González, J.J.;  
Ramírez Silva, L. H. y Vilchis Landeros, M.M.  
© ISSN-0188-137X



Versión electrónica en <http://bq.facmed.unam.mx/tab>

**MENSAJE BIOQUÍMICO**

Mens. Bioquim. 44 (2020) XX-XX



Memoria del 47° Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

### La regulación genética de la floración.

#### Flowering transition gene regulatory network.

García Ponce de León, Berenice<sup>1\*</sup>; Quiroz Pérez, Stella<sup>1</sup>; Yustis Rubio, Juan Carlos<sup>1</sup>;  
Martínez Hidalgo, Tania<sup>1</sup>; Garay-Arroyo, Adriana<sup>1</sup>; Sánchez Jimenez, María de la Paz<sup>1</sup> y  
Álvarez-Buylla, Rocés Elena<sup>1</sup>.

1. Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas. Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, UNAM

\*Correspondencia: Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología, UNAM. Circuito exterior junto al Jardín Botánico, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, CP 04510 Tel. +52 (55) 5622-9019, bgarcia@ecologia.unam.mx

---

#### Resumen

La transición a la floración es un proceso fundamental en el desarrollo de las plantas que marca el final del estado vegetativo y el paso al estado reproductivo. Su regulación dinámica en respuesta a señales intrínsecas del desarrollo y a señales ambientales como el fotoperiodo y la temperatura es de gran importancia porque afecta directamente la reproducción y la viabilidad de la descendencia y, por lo tanto, tiene repercusiones en la productividad de plantas de interés humano. En este sentido, es importante conocer la red de regulación genética que promueve de manera dinámica este complejo plan de desarrollo. *Arabidopsis thaliana* es una planta modelo en angiospermas que ha permitido grandes avances en el conocimiento de este proceso. En esta revisión resumimos de forma integral, la información relevante sobre la regulación de la floración en esta especie, e incluimos algunas de nuestras investigaciones en curso.

**Palabras clave:** floración, red de regulación genética, MADS-box, SPL, y FT.

#### Abstract

Flowering transition is a fundamental trait in plant development that marks the end of the vegetative state and the transition to the reproductive one. Its dynamic regulation both by intrinsic signals of development, and in response to environmental signals such as photoperiod and temperature is of great importance, since it directly affects the reproduction and viability of the offspring. Therefore, it has repercussions on the productivity of plants of human interest. In this sense, it is important to study the gene regulatory network that establishes this complex developmental process. *Arabidopsis thaliana* is a model plant in angiosperms that has allowed great advances in the knowledge of flowering transition. In this review we summarize the information about the genetic regulation of flowering transition in this plant by integrating the molecular responses to inductive signals, and we include some of our ongoing research.

**Key words:** flowering transition, gene regulatory network, MADS-box, SPL and FT.

---