

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Centre de Recerca Agrigenòmica

Tesis Doctoral

Rol de los genes RAV en la regulación de la inducción floral en respuesta a estrés abiótico:

Un análisis evolutivo y funcional

Memoria presentada por Unai Cereijo Álvarez de Eulate para optar al grado de Doctor en Biología y
Biotecnología Vegetal por la Universitat Autònoma de Barcelona

Trabajo realizado en el Programa de desarrollo y transducción de señales

Dra. Soraya Pelaz

Unai Cereijo

Barcelona, 2024

La realidad es tozuda

Ignacio Cota, 1.02

Agradecimientos

Escribo estos agradecimientos antes de terminar de redactar el manuscrito para obligarme a llegar hasta el final. Esta tesis ha sido todo lo que me dijeron que sería: casi cinco años de altibajos que me han cambiado y formado como investigador y como persona; espero, para bien.

Quiero empezar dando las gracias a Soraya, por la oportunidad de realizar este trabajo, por facilitarme el camino siempre que ha podido y por ayudarme a mantener el rumbo en todos los momentos en los que no me ha sido fácil ubicar el norte. No han sido pocos.

Esta tesis no existiría sin la ayuda de Michela y de Nacho. A Michela le debo el comienzo de este proyecto y el haber continuado apoyándome mucho después de haber dejado el grupo; a Nacho, su generosidad compartiendo su experiencia y su rigor. Hacemos mejor ciencia gracias a gente como él.

Me gustaría agradecer también a Barbara la calidez con la que me acogió en su laboratorio y el tiempo que me dedicó personalmente durante mi estancia.

A las personas del servicio del CRAG y, en concreto, a Gloria, Eva, Alejandro, Natalia y Toñi por su trabajo incansable y su cercanía.

Debo un agradecimiento especial a todas las personas que han pasado por el laboratorio 1.02, por haber hecho de estos años una experiencia amable.

Finalmente, a mi familia y amigos. Por soportar mis quejas y lamentos, por escuchar cientos de veces las mismas historias que no entendían, por haberme traído hasta aquí. Os quiero.

Gracias.

Resumen

La transición floral es un momento clave en el desarrollo del ciclo vital de las plantas al resultar determinante para su éxito reproductivo. Las plantas han desarrollado redes genéticas complejas para regular este proceso, integrando señales internas y externas antes de decidir cuándo florecer. Factores abióticos como la salinidad y la sequía juegan un papel significativo en esta decisión, afectando directamente la expresión genética relacionada con la transición floral.

En *Arabidopsis thaliana*, *TEMPRANILLO 1* (*TEM1*) y *TEM2*, pertenecientes a la familia *RAV* han sido identificados como represores de la inducción floral. La familia génica de factores de transcripción *RAV*, que comprende a 6 miembros en *Arabidopsis thaliana* se caracteriza por la presencia de dos dominios de unión a ADN (AP2 y B3).

Los genes *RAV* no solo son cruciales en *Arabidopsis thaliana* sino que se encuentran conservados a lo largo de toda la evolución vegetal, desempeñando un papel vital en la respuesta al estrés en diferentes especies, habiéndose demostrado su implicación en la respuesta a la salinidad en el maíz (Sun et al., 2020) o a la sequía en *Nicotiana tabacum* (Y. Gao et al., 2022).

En este trabajo se analiza el papel de los genes *TEM* en respuesta a salinidad y a sequía, revelándolos como represores en la transición floral ante ambos procesos en combinación con los genes *MYC*, *GI* y *SVP*.

Además, el estudio de los genes *RAV* del licofito *Seleganinella moellendorffii* y el helecho *Ceratopteris richardii* ha permitido confirmar la conservación de la función reguladora de los genes *RAV* desde representantes basales de la evolución vegetal y ha revelado una posible función en el desarrollo de estos organismos.

Abstract

The floral transition is a key moment in the life cycle development of plants as it is crucial for their reproductive success. Plants have developed complex genetic networks to regulate this process, integrating both internal and external signals before deciding when to flower. Abiotic factors such as salinity and drought play a significant role in this decision, directly affecting the genetic expression related to the floral transition.

In *Arabidopsis thaliana*, *TEMPRANILLO 1* (*TEM1*) and *TEM2*, belonging to the *RAV* family, have been identified as repressors of floral induction. The *RAV* gene family of transcription factors, which includes 6 members in *Arabidopsis thaliana*, is characterized by the presence of two DNA-binding domains (AP2 and B3).

RAV genes are not only crucial in *Arabidopsis thaliana* but are conserved throughout plant evolution, playing a vital role in the response to stress in different species, having been shown to be involved in the response to salinity in corn (Sun et al., 2020) or drought in *Nicotiana tabacum* (Y. Gao et al., 2022).

In this work we analyze the role of TEM genes in response to salinity and drought, revealing them as repressors in the floral transition in response to both processes in combination with the *MYC*, *GI*, and *SVP* genes.

Furthermore, the study of *RAV* genes from the lycophyte *Selaginella moellendorffii* and the fern *Ceratopteris richardii* has confirmed the conservation of the regulatory function of *RAV* genes from basal representatives of plant evolution and has revealed a possible function in the development of these organisms.

Tabla de contenido

<i>Agradecimientos</i>	<i>3</i>
<i>Resumen</i>	<i>4</i>
<i>Abstract</i>	<i>5</i>
<i>Índice de figuras</i>	<i>9</i>
<i>Introducción</i>	<i>14</i>
Evolución: general	15
Inducción floral.....	22
Los genes RAV	30
Estrés abiótico	32
Ultimas consideraciones	35
<i>Objetivos generales</i>	<i>36</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>37</i>
Estudios de la función de TEM en la respuesta a estrés abiótico.	37
Módulo GI-TEM-SVP en estrés abiótico	83
Evolución de los RAV	101
<i>Discusión</i>	<i>115</i>

TEM modula el desarrollo vegetativo y la inducción floral en respuesta a salinidad.....	115
TEM y MYC juegan papeles antagonistas en respuesta a la sequía	119
Los RAVs de plantas basales son capaces de regular la inducción floral	123
Conclusiones	125
Materiales y métodos.....	126
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	126
Clonación y obtención de constructos	127
Cruzamientos	127
Aislamiento de plásmidos	127
Transformación de las bacterias	128
Transformación de Arabidopsis thaliana	128
Selección de las líneas transgénicas.....	128
Estudio del tiempo de floración.....	128
Análisis de la densidad y morfología de los estomas	129
ChIP	130
Western blot	130
Interacciones Proteína-proteína	131
Análisis de Expresión	132

Hibridaciones <i>in situ</i>	132
Tinción DAB.....	134
Análisis de pigmentos fotosintéticos y anti-oxidantes	134
Análisis de la fluorescencia de la clorofila	134
<i>Bibliografía</i>	135
<i>Anexos</i>	161

Índice de figuras

Figura 1. Relaciones filogenéticas e innovaciones evolutivas a lo largo de la evolución vegetal.....	16
Figura 2. Esporofito maduro de <i>Selaginella moellendorffii</i>	17
Figura 3. Esquema del ciclo vital de los helechos.....	19
Figura 4. Síntesis y movimiento del florigeno <i>FT</i>	24
Figura 5. Expresión de miRNA156 y miRNA172 a lo largo del tiempo de desarrollo de la planta	28
Figura 6. Estructura genérica de un gen <i>RAV</i>	30
Figura 7. Esquema de la integración de las rutas que regulan la transición floral	31
Figura 8 .Análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados en <i>TEM1-SE</i>	38
Figura 9. Respuesta al estrés salino de plantas cuya expresión de los genes <i>TEM</i> se encuentra alterada.	40
Figura 10. Efecto de la salinidad sobre la transición floral en condiciones de SD y LD	42
Figura 11. Análisis de expresión de genes reguladores de la transición floral	44
Figura 12. Efecto de la salinidad en la germinación de plantas <i>tem</i>	45
Figura 13. Efecto de la salinidad en la germinación y primeras fases del desarrollo.....	46
Figura 14. Efecto de la salinidad en el desarrollo de las primeras fases del ciclo vital..	47
Figura 15. Efecto de la salinidad sobre la germinación y el desarrollo de las plántulas.	48

Figura 16. Patrones de expresión de <i>MKK9</i> , <i>SAG13</i> y <i>SAG12</i>	49
Figura 17. Análisis de la acumulación de la sustancias ROS en plantas sometidas a senescencia inducida por estrés salino	50
Figura 18. Análisis de la senescencia asociada a marcadores fisiológicos y mecanismos fotoprotectores en respuesta a estrés salino.	52
Figura 19. Análisis preliminares de la posible interacción de MYC2 y TEM1.....	54
Figura 20. Ensayos BiFC para la Interacción in vivo entre TEM1 y MYCs.....	55
Figura 21 Ensayos BiFC para la interacción uno a uno de represores florales	57
Figura 22. Detección del polimorfismo de nucleótido único COP1 en fondos genéticos WT y <i>myc/tem</i>	58
Figura 23. Caracterización fenotípica de mutantes múltiples <i>myc cop1</i> y <i>tem</i> en la transición floral.....	60
Figura 24. Análisis del desarrollo reproductivo en mutantes múltiples <i>myc cop1</i> y <i>tem</i>	61
Figura 25. Análisis morfológico de las semillas producidas por mutantes múltiples <i>myc cop1</i> y <i>tem</i>	63
Figura 26. Caracterización molecular de mutantes múltiples <i>myc cop1</i> y <i>tem</i> en la transición floral.....	65
Figura 27. Análisis de la expresión de reguladores del crecimiento reproductivo en mutantes múltiples <i>myc cop1</i> y <i>tem</i>	67
Figura 28. Interacción in vivo entre TEM1 y regiones regulatorias de <i>SOC1</i>	68

Figura 29. Efecto de la pérdida de función de <i>MYC</i> y <i>TEM</i> en la expresión de miembros de la ruta autónoma.....	70
Figura 30. Análisis de modificaciones de histonas de <i>FLC</i> en mutantes <i>myc cop1</i> y <i>tem</i>	72
Figura 31. Efecto la temperatura cálida sobre el tiempo de floración y la expresión de reguladores de la inducción floral de mutantes <i>myc cop1</i> y <i>tem</i>	75
Figura 32. Efecto de la limitación de agua en el crecimiento y la floración de mutantes <i>myc cop1</i> y <i>tem</i>	77
Figura 33. Análisis fisiológicos de mutantes <i>myc cop1</i> y <i>tem</i> en respuesta a la privación de agua.	79
Figura 34. Caracterización de los fenotipos de los estomas de los mutantes <i>myc cop1</i> y <i>tem</i> en condiciones controladas	80
Figura 35. Análisis morfológicos de hojas de mutantes <i>myc cop1</i> y <i>tem</i> en condiciones de buena hidratación y de limitación severa de agua.	82
Figura 36. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día largo	83
Figura 37. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día corto	84
Figura 38. BiFC entre lo miembros de la familia RAV, GI, SVP y TPL	86
Figura 39. RT-qPCR del florigeno a dos tiempos en las cuatro líneas de interés.	88
Figura 40. Número de hojas de roseta hasta la floración.....	88
Figura 41. Niveles de expresión relativa a <i>IFe4</i> de <i>GI</i> y <i>TEM</i>	89
Figura 42. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día largo en condiciones crecientes de salinidad.	90

Figura 43. Niveles de expresión de los genes <i>SOS1</i> , <i>SOS2</i> y <i>SOS3</i> en plantas <i>gi tem</i> ...	91
Figura 44. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día corto.	92
Figura 45. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día largo.	93
Figura 46. Niveles de expresión de <i>SVP</i> en los diferentes mutantes.	94
Figura 47. Experimento de floración en LD de las plantas <i>gi tem svp</i>	95
Figura 48. Tasa de germinación en condiciones de salinidad.	96
Figura 49. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
Figura 50. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
Figura 51. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	100
Figura 52. Árbol filogenético de los genes RAV con alguna implicación en estrés abiótico identificada en la literatura.	102
Figura 53. Expresión de las proteínas SmRAV en líneas T3 y T4 de <i>Arabidopsis</i>	103
Figura 54. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración de plantas <i>Arabidopsis thaliana SmRAV2-SE</i> en LD	104
Figura 55. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración de plantas de <i>Arabidopsis thaliana SmRAV2-SE</i> en LD	105
Figura 56. Análisis BiFC de los interactores de SmRAV	107

Figura 57. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración de líneas independientes de plantas <i>Arabidopsis thaliana</i> CrRAV-SE en LD	108
Figura 58. Expresión de <i>CrRAV1</i> y 2 en diferentes puntos del desarrollo.	109
Figura 59. Expresión de <i>CrRAVs</i> a días 7, 10 y 13 tras la germinación.....	110
Figura 60. Comparación de expresión de los genes <i>CrRAVs</i> en gametofitos Machos y Hermafroditas a 10 y 13 días.....	111
Figura 61. Expresión de los genes <i>CrRAV</i> en <i>Ceratopteris richardii</i>	112
Figura 62. Expresión de <i>CrRAVs</i> en gametofitos sometidos a tratamiento de salinidad	114
Figura 63. Número de <i>RAVs</i> asociados a estrés abiótico en cada especie mediante revisión bibliográfica.....	161
Figura 64. Listado de óligos utilizados en el desarrollo de este trabajo	162

Introducción

Todos los seres vivos descendemos de un único evento datado hace más o menos tres mil quinientos millones de años. Nos referimos como LUCA (*Last Universal Common Antecesor*) al ancestro común entre todos los seres que hoy poblamos la tierra y que marca el comienzo de una diversificación alimentada por el azar y la necesidad de adaptarse al ambiente (Woese et al., 1990). No entendemos bien ni el cómo ni el porqué de la aparición de la vida en la tierra, pero si hubo eventos previos no consiguieron llegar muy lejos y cualquier nuevo evento que pudiera darse con posterioridad es frenado por los que ya estamos aquí (Prosdocimi & de Farias, 2023).

Debido a esta historia natural compartida, la genética de todos los organismos sigue unos patrones de funcionamiento similares. Conservamos un código genético común (Crick et al., 1961) y utilizamos herramientas similares para dar respuesta a los cambios y dificultades que el medio nos presenta. Esta capacidad de adaptación tiende a la reutilización del material génico preexistente para darle un nuevo uso de acuerdo con las necesidades presentes (Kimura & Ohta, 1974).

Esta adaptación es especialmente relevante para las plantas. Dada su naturaleza sésil, ahí donde los animales podemos huir, las plantas no tienen otra estrategia que enfrentar las adversidades adaptando su funcionamiento interno. Es por esto por lo que a lo largo de su historia evolutiva han desarrollado diferentes vías que les ayudan a lidiar con todo tipo de hostilidades, ya sea a través de la tolerancia, resistencia o la aceleración de su ciclo vital (Park et al., 2016).

Evolución: general

Las plantas colonizan la tierra hace unos 500 millones de años, para lo cual fue necesaria la aparición de características tales como el desarrollo de tejidos vasculares, estructuras de soporte, protección contra la desecación y mecanismos de reproducción adaptadas a la tierra (Morris et al., 2018).

Las angiospermas se hacen ubicuas en el planeta hacia el final del cretácico y su aparición en la tierra se suele situar en el cretácico temprano, aunque pueden reconocerse en fósiles del jurásico o anteriores (Herendeen et al., 2017).

La hipótesis principal apunta que las angiospermas dominan sobre el resto de clados, además de por su capacidad de atraer polinizadores, gracias a un aumento en su potencial máximo de fotosíntesis y su capacidad para la captura de carbono. Esto les ha permitido superar a los helechos y los gimnospermas que anteriormente dominaban los ecosistemas terrestres. Igualmente, la tendencia a reducir el tamaño del genoma en angiospermas ayudó en este proceso (Simonin & Roddy, 2018), puesto que los genomas más reducidos permiten la construcción de células más pequeñas que, a su vez, permiten una mayor captación de CO₂ y mayor ganancia de carbono fotosintético (X. Wang et al., 2021).

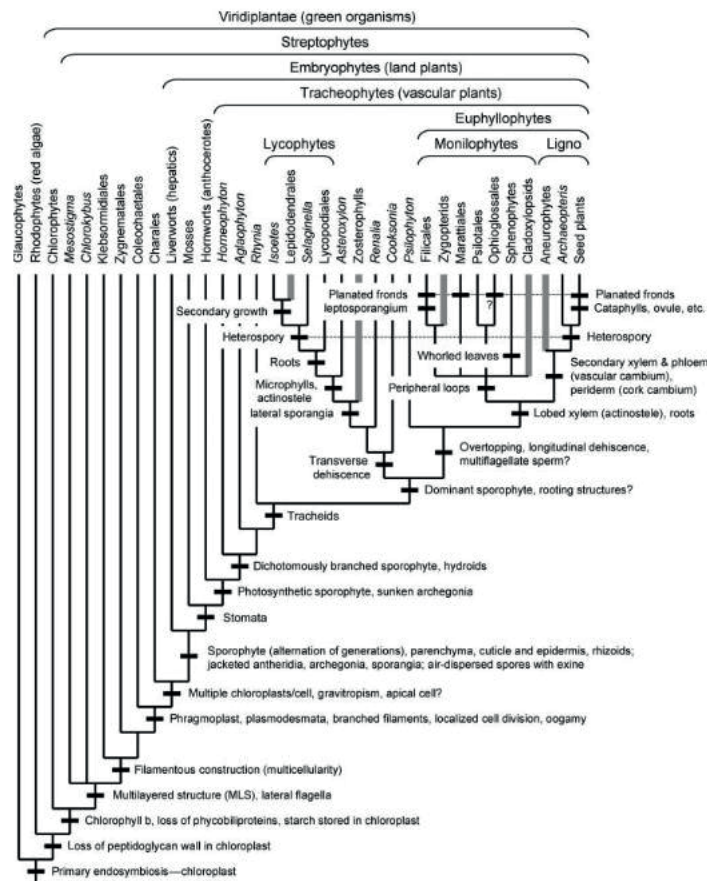


Figura 1. Relaciones filogenéticas e innovaciones evolutivas a lo largo de la evolución vegetal

En el desarrollo de esta tesis se ha prestado atención a tres clados representativos de la historia evolutiva de las plantas terrestres: Licofitos, los vegetales más basales con vasculatura lineal; helechos, representantes de plantas con vasculatura ramificada y sin semilla y, finalmente, angiospermas, el grupo que presenta el mayor número de caracteres derivados y cuya característica principal es el desarrollo de flores como órgano sexual (Figura 1).

En los siguientes apartados, se presentan las características de interés de estos tres clados seleccionados.

Licofitos: *Selaginella moellendorffii*

Las plantas licofitas ocupan un lugar de especial interés en el estudio de la evolución vegetal ya que han desarrollado comportamientos y caracteres derivados, como las hojas o la arborescencia propios de las plantas vasculares, de manera independiente y, a su vez, conservan caracteres primitivos como la reproducción por esporas. Se sitúan así en un medio camino entre las plantas briofitas y las vasculares (Ambrose, 2013).



Figura 2. Esporofito maduro de *Selaginella moellendorffii*

Selaginella moellendorffii (Figura 2) tiene un largo recorrido como planta modelo por diferentes razones. Su genoma es compacto y se encuentra secuenciado desde hace años (Ferrari et al., 2020), lo que ha facilitado la identificación de genes implicados en la transición de las plantas del mar a la tierra, así como genes especializados diferentes de las plantas con flores, lo que ayuda a entender la evolución temprana y el desarrollo de las plantas vasculares (Zhu et al., 2017).

Su ciclo de vida relativamente corto y su tamaño compacto facilitan su cultivo en condiciones de laboratorio controladas. Además, tiene requisitos de crecimiento simples, lo que permite a los investigadores cultivarla eficientemente para estudios experimentales. Estas características, junto con la disponibilidad de su secuencia genómica completa, la hacen ideal para estudios de biología molecular y evolutiva. (Banks et al., 2011) y es ampliamente utilizada en estudios de desarrollo (Carey et al., 2013; Jacobs, 1988).

Traqueófitos: *Ceratopteris richardii*

Los helechos ocupan una posición intermedia en el árbol evolutivo de las plantas vasculares. Similarmente a las angiospermas, los helechos cuentan con hojas verdaderas, lo cual refleja su sistema vascular relativamente avanzado. Dado que los helechos presentan características típicas tanto de plantas terrestres primitivas como de formas más evolucionadas, son fundamentales para comprender cómo han evolucionado los cambios genéticos en la maquinaria reguladora básica que subyace al desarrollo y la morfología de las plantas (Banks, 1999).

Este clado se encuentra definido por presentar esporofitos con raíces adventicias, hojas grandes que se despliegan y esporangios en la superficie abaxial de las hojas. Sus gametofitos son pequeños, exospóricos y de vida libre (Banks, 1999).

En los últimos años se han realizado estudios transcriptómicos en esporofitos jóvenes de *Ceratopteris richardii* que han aportado información sobre la conservación de factores definitorios de células madre en el meristemo de la raíz (Aragón-Raygoza et al., 2022).

Aunque los helechos no son cultivo de interés agrícola y tienen un impacto menor para el desarrollo humano, nos son útiles para entender el desarrollo evolutivo vegetal. Al igual que el resto de plantas vasculares, los helechos presentan una alternancia en el ciclo vital: una fase diploide esporofítica y una fase haploide gametofítica. La fase esporofítica presenta una reproducción asexual, en la que se producen esporas y la fase gametofítica de reproducción sexual en la que se producen gametos (Figura 3).

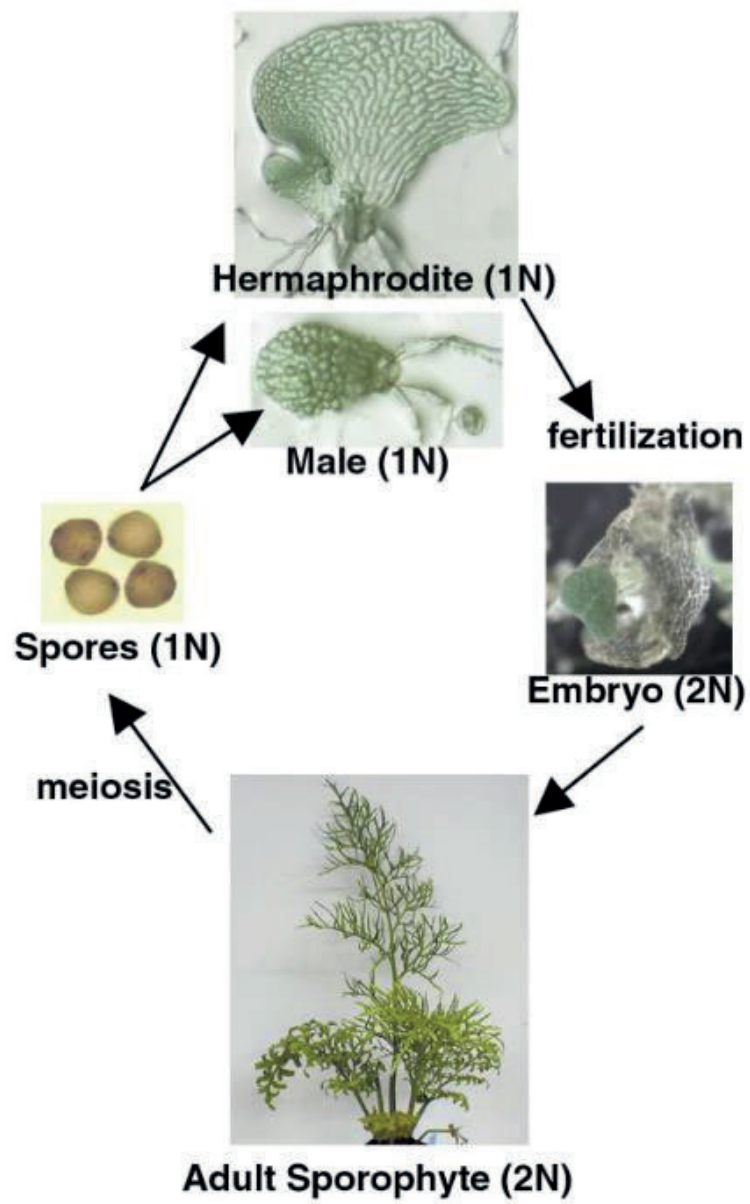


Figura 3. Esquema del ciclo vital de los helechos.

Ceratopteris es un género anual semitropical que crece en entornos semiacuáticos, incluyendo arrozales. Su ciclo de vida es relativamente corto, alrededor de tres a cuatro meses de espora a espora. La planta esporofítica diploide forma hojas que producen alrededor de 10^6 esporas haploides al mes. Estas mismas hojas también generan cientos de brotes vegetativos adventicios en las axilas de las hojas, permitiendo así la propagación vegetativa de cada planta. La capacidad de generar grandes cantidades de esporas genéticamente idénticas a partir de un esporofito derivado de un cruce intragametofítico es importante para los estudios genéticos, ya que permite el aislamiento de inhibidores o supresores de mutaciones conocidas en un período de tiempo muy corto. La alta producción de esporas también es una ventaja para los estudios moleculares y bioquímicos del desarrollo temprano del gametofito, ya que la obtención de suficientes esporas para el estudio no representa una limitación.

El genoma de *Ceratopteris richardii* fue publicado en 2019 (Marchant et al., 2019) lo que ha permitido empezar a realizar estudios moleculares. Durante las últimas décadas se han identificado varias líneas mutantes que han permitido estudiar su fotomorfogénesis (Cooke et al., 1993, 1995), defectos del citoesqueleto (Duckett et al., 1979; Vaughn et al., 1990), resistencia a diferentes sustancias (Carroll et al., 1988; Hickok et al., 1991; Hickok & Schwarz, 1986, 1989) y, especialmente, la diferenciación y determinación del sexo (Banks, 1994, 1997).

Es de especial interés el sistema por el cual ocurre la determinación del sexo en los gametofitos. Las primeras esporas en germinar se desarrollan siempre como hermafroditas y empiezan a producir una sustancia conocida como anteriodiógeno que condiciona el desarrollo de las esporas que germinan más tarde, haciendo que estas se desarrollen como machos (Atallah et al., 2018).

La regulación del anteriodiógeno es multifactorial y se ve afectada por las condiciones de crecimiento de los gametofitos, así como las variaciones de temperatura del entorno, las condiciones lumínicas e incluso las propias características del sustrato en el que se encuentran creciendo los helechos {Citation}. Se trata de una regulación compleja. Por ejemplo, la luz azul es capaz de activar la señal del anteriodiógeno (Kamachi et al., 2007).

Una de las ventajas que presenta este modelo es que es potencialmente transformable tanto de forma estable como transitoria ya sea mediante bio-balística tras la generación de callos (Plackett et al., 2015) como por incubación de los gametofitos con *Agrobacterium tumefaciens* (Bui et al., 2015).

Arabidopsis thaliana

El potencial de *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo para la genética vegetal se discute por primera vez en 1943 por F. Laibach (Laibach, 1943), quien ya había publicado el número correcto de cromosomas en 1907 (Laibach, 1907). Entre sus ventajas se encuentra: ser pequeña y de ciclo vital rápido, lo que permite el cultivo en grandes cantidades sin necesidad de utilizar mucho espacio y la obtención de una gran producción de semillas, facilitando así la selección y comparación de mutantes. Por último, en el año 2000 se secuenció por primera vez su genoma (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). y desde entonces se han realizado cientos de estudios, llegando a un nivel de conocimiento alto sobre el funcionamiento de los genes de este organismo (Srikanth & Schmid, 2011).

La inducción floral de esta planta es de día largo (LD) facultativo, esto es: la inducción floral será lanzada de forma preferente en periodos de 16h de luz y 8h de oscuridad, pero si las condiciones no inductoras se mantienen durante un tiempo suficientemente largo, también florecerá en condiciones de día corto (SD; 18h de luz y 16h de oscuridad) (Zeevaart, 2009).

Inducción floral

Conocemos como floración al proceso mediante el cual las angiospermas producen sus órganos sexuales. En este proceso se distinguen dos etapas principales. La inducción floral, en la que el meristemo vegetativo apical se compromete a la formación de las flores y el desarrollo floral, en el que ocurren los cambios morfológicos que permitirán la formación de los órganos reproductores (Poethig, 1990).

El momento de la floración es clave en la historia vital de las plantas. En el caso de las plantas anuales, una floración temprana, cuando la reserva energética es pequeña, llevará a la planta a producir un número menor de flores y, por tanto, de semillas. Por otro lado, un retraso excesivo de la floración acerca la llegada del invierno, impactando negativamente en la maduración del fruto y las semillas. En estos dos casos, el éxito reproductor de la planta se verá afectado negativamente (Amasino, 2010).

Dada la importancia de determinar correctamente el mejor momento para florecer y, asumiendo que mejor florecer en un momento malo que no hacerlo en absoluto, las plantas monitorizan diferentes estímulos externos y señales endógenas para lanzar la floración.

Entre los estímulos externos y, sólo en aquellas plantas que viven fuera de los trópicos, el estímulo principal es el fotoperiodo; esto es, el número de horas de luz solar por cada ciclo de 24h. También son monitorizadas la calidad de la luz, la temperatura y la estación del año. Entre las señales endógenas que determinan la inducción floral encontramos la edad y estado madurativo de la planta, la acumulación de reservas energéticas y los efectos que la presencia de estresores bióticos y abióticos hayan podido ejercer sobre el estado fisiológico general de la planta (Amasino, 2010).

Llamamos transición floral al proceso mediante el cual el meristemo apical del tallo (SAM, del inglés *shoot apical meristem*) adquiere la competencia reproductiva y se compromete de manera irreversible a la producción de flores (Tooke et al., 2005) una vez

las plantas adquieren la capacidad de responder a las señales inductoras (Adrian et al., 2009; Amasino, 2010; Srikanth & Schmid, 2011).

Florígeno

Podemos situar el comienzo del estudio de la inducción floral en los trabajos realizados por Julius Sachs en 1865, de los cuales deriva el concepto de hormona vegetal. De sus experimentos con *Tropaeolum majus* y *Ipomoea purpurea* dedujo que en las hojas expuestas a la luz se producía una sustancia que en muy pequeñas cantidades era capaz de inducir la floración en los tallos cultivados en oscuridad (Sachs, 1865). Sin embargo, las pruebas más convincentes en apoyo del florígeno aparecen con el descubrimiento del fotoperiodo, esto es, la respuesta de las plantas a la longitud relativa del día y la noche (Garner & Allard, 1922). Después llegaría la evidencia de que, pese a que las flores se forman en el meristemo apical del tallo, el fotoperiodo se registra a través de las hojas (Knott, 1934), apuntando por primera vez que la señal producida en las hojas debía moverse una larga distancia hasta inducir la floración en el meristemo apical. Más tarde, se demostró que esta señal también podía ser transmitida de una planta ya inducida que actuara como donante a una planta no inducida como receptor, provocándole la floración a ésta última. En 1936 Chailakhyan introduce por primera vez el concepto de florígeno para este estímulo inductor de la floración y lo definió como un conjunto de sustancias con función reguladora (Chailakhyan, 1936).

Los experimentos realizados entre especies cercanas, pero con respuesta a diferentes fotoperiodos demostró que esta señal florígena era indiferente a los diferentes tipos de respuesta. Un concepto que fue revisado una y otra vez durante los siguientes años y que viene a mostrar que se trata de una señal muy conservada durante la evolución.

No obstante, a pesar de la multitud de intentos para aislar el florígeno fue un concepto fisiológico más que un compuesto concreto hasta que en 2007 se identificó el gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* como mensajero de esta señal (Turck et al., 2008).

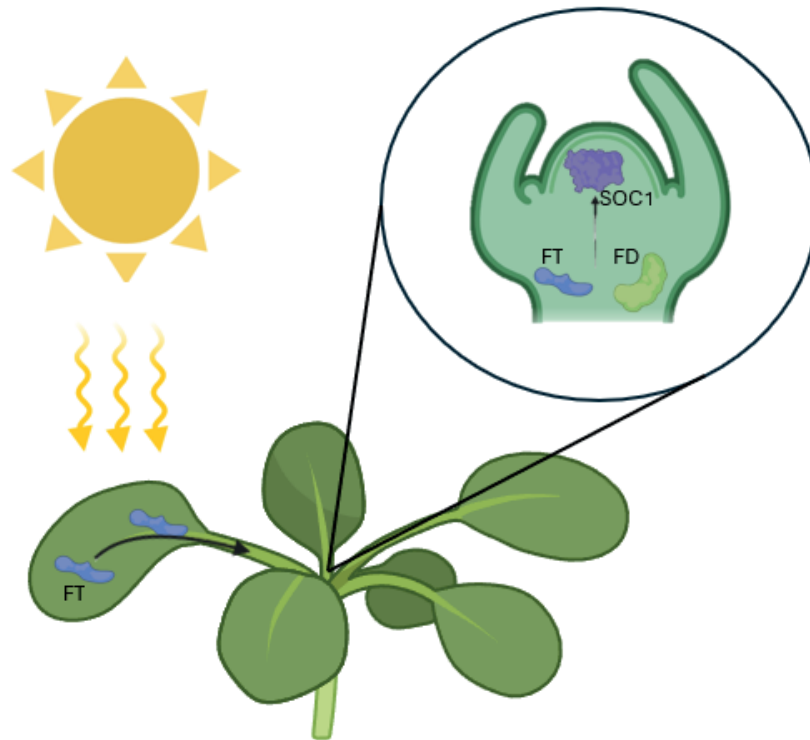


Figura 4. Síntesis y movimiento del florígeno FT

Así, la proteína FT migra desde las hojas hasta el SAM, provocando el cambio de identidad del meristemo y promoviendo el cambio de la fase vegetativa a la reproductora.

Rutas que regulan la inducción floral

Las rutas encargadas de dar respuesta a los estímulos ambientales y a las señales internas de la planta forman una intrincada red de genes, incorporando y procesando la información recibida para regular el momento adecuado para la floración (Amasino, 2010).

De estas rutas, la mejor estudiada es la que responde al fotoperiodo. Esta red, en *Arabidopsis*, induce la floración en condiciones de día largo (LD). La segunda señal de mayor peso es la temperatura ambiental, que puede dividirse en dos rutas diferentes: la exposición a un frío prolongado (la vernalización) y la propia de temperaturas moderadas.

Dado su gran impacto en el proceso de floración, tanto la ruta del fotoperiodo como la vernalización han sido extensivamente estudiadas y disponemos de una buena caracterización de su composición y funcionamiento (Andrés & Coupland, 2012; Srikanth & Schmid, 2011).

Entre las señales internas, se distinguen mayoritariamente dos. Por un lado, existe una regulación autónoma de la floración, paralela a las señales externas, que promueve la floración aunque la planta no sea expuesta a las condiciones idóneas para ello. Por otro, se distingue una ruta asociada a la edad, regulada por el equilibrio en la expresión de dos microRNAs que actúa a modo de reloj de arena para asegurar la floración (Poethig, 2010).

Así, estas rutas están formadas por genes que promueven la inducción floral y otros que la inhiben. La expresión de unos u otros vendrá determinada por señales ambientales e internas, cuya suma de fuerzas determinará el momento de la transición de la fase vegetativa a la reproductora.

Fotoperiodo

Las fluctuaciones anuales en la duración del día que ocurren en gran parte de la superficie de nuestro planeta proporcionan una señal ambiental confiable sobre la época del año. Por lo tanto, no es sorprendente que las vías que detectan y promueven la floración en respuesta al fotoperiodo sean de las más antiguas y conservadas.

Arabidopsis florece más rápidamente en días largos que en días cortos, por lo que es una planta facultativamente de día largo. La regulación del promotor floral *CONSTANS* (CO) es clave en la percepción de los días largos inductivos (Turck et al., 2008). El reloj circadiano regula la transcripción de CO de manera que la expresión máxima ocurre tarde en el día en días largos, pero después del anochecer en días cortos (Suárez-López et al., 2001). A su vez, la proteína CO es estabilizada por la luz y se degrada rápidamente en la oscuridad (Valverde et al., 2004). Como resultado, la proteína CO solo puede acumularse durante los días largos inductivos. CO se expresa en la vasculatura de las hojas, y su función en la floración es activar la expresión de *FLOWERING LOCUS T* (FT), que

codifica una pequeña proteína que actúa como florígeno. Una vez en el meristemo, FT forma un complejo con el factor de transcripción bZIP FD e inicia la floración activando genes de identidad del meristemo floral, como APETALA1, y otros promotores florales como SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1) (Michaels, 2009). Por lo tanto, la regulación al alza de FT marca el final de una vía de percepción del entorno e inicia el desarrollo de las flores.

Cambios en la temperatura ambiental

La variación estacional de las temperaturas es otra de las señales que condicionan el momento de la inducción floral (J. H. Lee, Park, et al., 2007). En Arabidopsis, el cultivo a temperaturas bajas (16°C) o altas (27°C) provoca un retraso en la floración respecto del cultivo a temperaturas medias (23°C) (Balasubramanian & Weigel, 2006; Blázquez et al., 2003). Esto es debido a una acumulación más baja del florígeno fuera del rango de los 22°C (Balasubramanian & Weigel, 2006). Mientras que a 22°C, el florígeno FT se acumula a mayor nivel que TSF, a 16°C encontramos la situación opuesta (Balasubramanian & Weigel, 2006; J. H. Lee et al., 2012, 2013), lo que indica que si bien, FT es el principal responsable de la inducción floral a 22°C, fuera de ese rango TSE adquiere un papel protagonista.

La regulación de esta ruta es llevada a cabo por varios genes de la familia MADS box, una familia de genes que codifica factores de transcripción involucrados en diversos procesos del desarrollo vegetal y, en especial, del sistema reproductor de angiospermas, regulando desde el momento de la transición hasta la morfología de las flores y el desarrollo de las semillas (Becker, 2003; Nam et al., 2004; P. Zhou et al., 2023). Entre ellos *SVP*, *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *FLOWERING LOCUS M (FLM)*, (Balasubramanian & Weigel, 2006; J. H. Lee, Yoo, et al., 2007; D. Li et al., 2008).

SVP juega un rol de alta importancia en la represión de la inducción floral en respuesta al frío. Los mutantes *svp* florecen anticipadamente con independencia a la temperatura ambiental (Fornara et al., 2010; J. H. Lee et al., 2012, 2013), con una producción constante de hojas tanto a 16°C que a 23°C (J. H. Lee, Yoo, et al., 2007). la expresión de

los inductores *FT* y *SOC1* en estas líneas son superiores que en plantas WT, provocando una floración temprana. Asimismo, en las líneas *SVP-SE* estos genes se encuentran inhibidos y su acumulación es menor que en las plantas silvestres (D. Li et al., 2008), por lo que su floración se retrasa. SVP es capaz de reprimir la expresión de *FT* y de *TSF* en las hojas y la de *SOC1* en el SAM (Jang et al., 2009; D. Li et al., 2008) mediante la unión CArG (CC(A/T)₆ GG) de sus promotores (Hartmann et al., 2000; J. H. Lee, Yoo, et al., 2007; Srikanth & Schmid, 2011).

Ha sido observado que SVP forma homodímeros y heterodímeros para unirse a secuencias diana con FLM y FLC (J. H. Lee, Yoo, et al., 2007). A temperaturas bajas, los mayores niveles de FLC y SVP permite una formación de hetero y homodímeros mayor de represores (Mateos et al., 2015) mientras que, el efecto de la temperatura sobre el procesamiento del mRNA de FLM impide la formación de los heterodímeros a medias y altas-temperaturas y por tanto, la represión de *FT* no tiene lugar (Posé et al., 2013).

Edad de la planta y giberelinas

La ruta que monitoriza la edad de la planta depende de la regulación de dos miRNA (miRNA156 y miRNA172) cuya expresión correlaciona de manera inversa (Wu et al., 2009) (Figura 5).

Durante las primeras fases del desarrollo de la planta la expresión de miRNA156 es alta y decae según la planta se va desarrollando. La expresión del miRNA156 inhibe la expresión de los genes *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*). Por tanto, los *SPL* sólo son activos en fases más avanzadas del ciclo de la planta. La activación de estos *SPL* promueve la expresión del miRNA172, que a su vez es capaz de reprimir la actividad de represores de la floración de genes como *AP2-like* permitiendo así la inducción de *FT* (Wu & Poethig, 2006) y a través de la activación directa de *SOC1* (J. Lee & Lee, 2010).

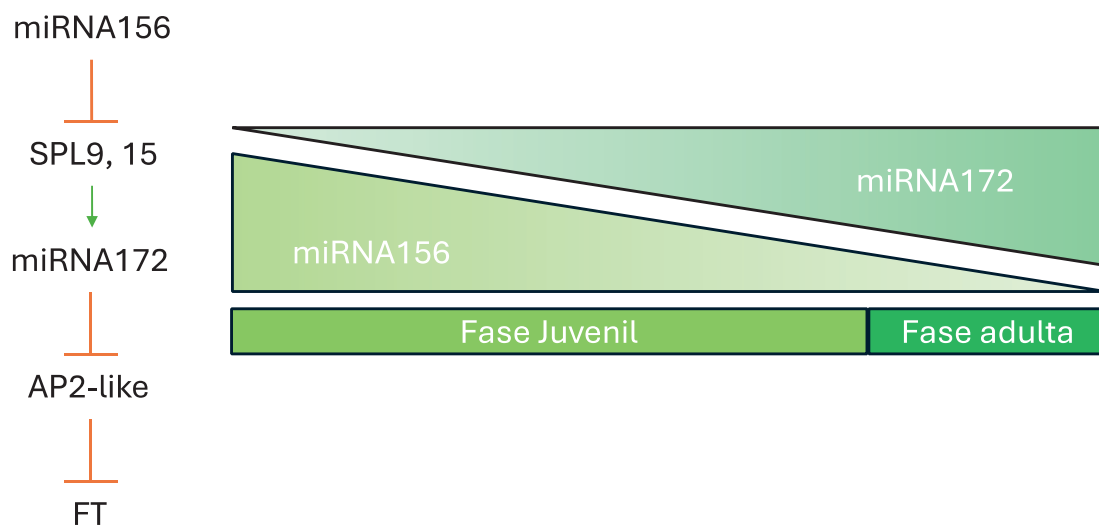


Figura 5. Expresión de miRNA156 y miRNA172 a lo largo del tiempo de desarrollo de la planta

Por su lado, *Arabidopsis*, como planta facultativa de día largo (LD), florece de manera anticipada bajo condiciones de fotoperiodo favorable. Sin embargo, también tiene la capacidad de inducir la floración en condiciones de día corto (SD), que no son inductivas. En SD, la expresión del gen FT, un promotor clave de la floración, se reduce significativamente debido a que el pico de expresión de CO, su activador, no se alinea con las horas de luz. Esto resulta en la degradación de la proteína CO debido a su inestabilidad en ausencia de luz. En tales condiciones, las giberelinas (GAs) desempeñan un papel crucial en la inducción de la floración, compensando la reducida expresión de FT y asegurando la reproducción de la planta incluso bajo condiciones ambientales adversas (Wilson et al., 1992).

Las giberelinas son sintetizadas en las hojas y se trasladan hasta el SAM, donde se acumula su forma bioactiva, la GA4. En el contexto de SD, las GAs actúan como un promotor fundamental de la floración, similar al papel de FT en condiciones de LD. La acumulación de GAs en el SAM estimula la inducción de genes clave en la floración, como SOC1, LFY, y FT, facilitando la transición floral (Blázquez & Weigel, 2000).

La síntesis y de regulación de las GAs, está regulada por señales endógenas asociadas al desarrollo de la planta. Específicamente, las enzimas GA20-oxidasa y GA3-oxidasa (GA3ox) son cruciales en los pasos finales de la biosíntesis de GA4. Entre los genes que codifican para GA3ox, una familia multigénica compuesta por al menos cuatro miembros (GA3ox1 a GA3ox4) juega un papel importante (Hedden & Phillips, 2000). Se está avanzando en comprender cómo cada uno de estos contribuye a ajustar los niveles de GAs y el desarrollo de la planta, particularmente, GA3ox1 y GA3ox3, que son esenciales para la producción de GAs durante la transición floral (Mitchum et al., 2006).

Vernalización y ruta autónoma.

El paso del invierno es una señal ambiental que, cuando se combina con la percepción del fotoperiodo, proporciona información estacional clara que distingue las estaciones de primavera y otoño. Definimos la vernalización como el proceso por el cual la exposición al frío del invierno otorga a las plantas competencia para florecer (D.-H. Kim et al., 2009).

Para que el frío sea una señal confiable de invierno, las plantas necesitan ser capaces de distinguir la exposición prolongada al frío característica del invierno de las fluctuaciones cortas de temperatura que podrían ocurrir, por ejemplo, en el otoño. Por lo tanto, no es sorprendente que la vernalización (y en muchas especies la rotura de la dormancia de las yemas) requiera una exposición al frío prolongada. Así, la vernalización se encuentra a menudo en plantas anuales de invierno y bienales que florecen temprano en la primavera; estas plantas suelen germinar en otoño, y la vernalización garantiza que no ocurra una floración prematura.

En *Arabidopsis*, el bloqueo de respuesta a la vernalización para la floración requiere la interacción de dos genes, *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *FRIGIDA (FRI)* (Johanson et al., 2000). FLC es un factor de transcripción que contiene un dominio MADS y actúa como represor floral, y FRI es una proteína específica de plantas de función bioquímica desconocida requerida para obtener niveles elevados de expresión de FLC (Michaels & Amasino, 2001). FLC inhibe la floración al reprimir directamente a los promotores clave de la floración, FT, SOC1 y FD (Michaels, 2009). Así, la vernalización permite que las

plantas florezcan rápidamente en los días alargados de la primavera a través de la represión de FLC. Las plantas invierno-anales contienen alelos funcionales de ambos genes, mientras que los ecotipos de ciclo rápidos contienen mutaciones de pérdida o reducción de función en FRI o FLC (D.-H. Kim et al., 2009).

La ruta autónoma no depende directamente de las señales externas, sino que está relacionada con el estado interno y madurativo de la planta y, al igual que la vernalización, actúa mediante la represión de *FLC* (Helliwell et al., 2006).

Los genes RAV

La acción de factores de transcripción represores de la expresión de otros efectores de la inducción floral es clave para la correcta regulación de este proceso, puesto que cumplen la función de impedir que la floración ocurra en fases tempranas del desarrollo de la planta aunque las condiciones externas la propicien (Yant et al., 2009). De entre estos factores de transcripción nosotros centramos el interés en la familia génica *RAV*.

La familia *RAV* consta de 6 miembros en *Arabidopsis*: *RAV1*, *RAV1-like (RAV1L)*, *RAV2 (TEM2)*, *RAV2L (TEM1)*, *RAV3* y *RAV3L* (Matías-Hernández et al., 2014; Yamasaki et al., 2004). Esta familia de factores de transcripción se distingue por presentar dos dominios de unión a DNA, el dominio AP2/ERF y el dominio B3 (Riechmann & Meyerowitz, 1998).

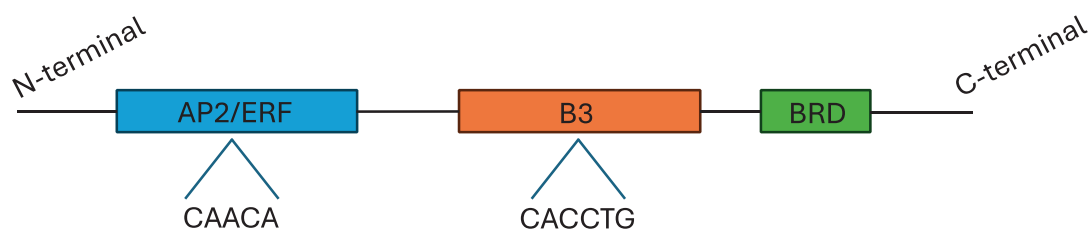


Figura 6. Estructura genérica de un gen *RAV*

El dominio de unión B3 se encuentra en el extremo C-terminal y reconoce la secuencia consenso CACCTG. A su vez, el dominio AP2 se encuentra en el extremo N-terminal y reconoce la secuencia consenso CAACA (Kagaya et al., 1999). Un tercer dominio ayuda en la actividad represora de los RAV; el dominio BRD (B3 repression domain) mediante una secuencia altamente conservada R/KLFGV (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009) (Figura 6).

Previo a mi llegada al laboratorio los genes *RAV2* y *RAV2L* fueron caracterizados y renombrados como *TEM2* y *TEM1* respectivamente dada su función como represores de la inducción floral. Esta función represora se ejerce directamente sobre la expresión *FT* (Castillejo & Pelaz, 2008) y sobre la expresión de dos genes clave en la biosíntesis de GAs, *GA3OX1* y *GA3OX2* (Osnato et al., 2012).

Además de regular la floración, los genes *RAV* toman parte de la señalización de otros procesos propios del ciclo de las plantas, tales como la regulación de la respuesta a hormonas vegetales, el desarrollo vegetal, y la respuesta a estrés (Matías-Hernández et al., 2014).

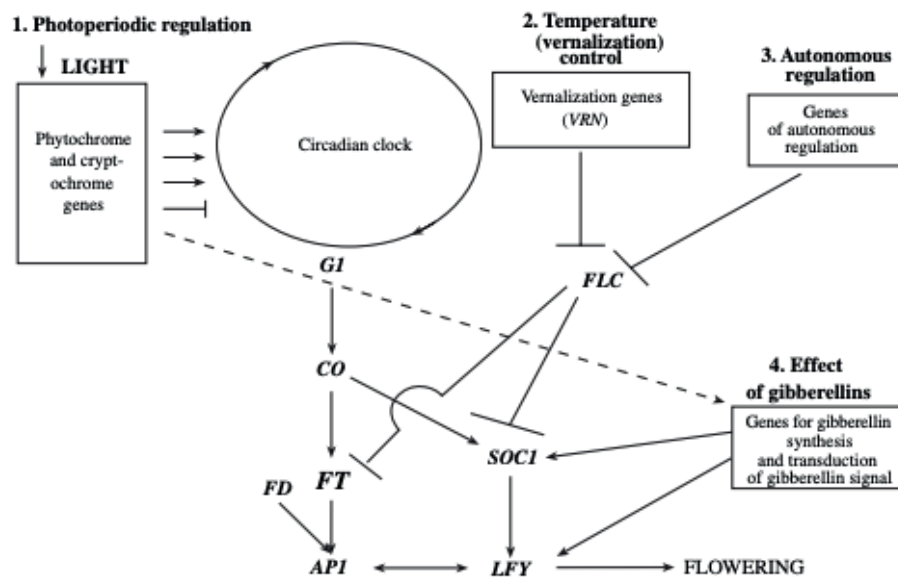


Figura 7. Esquema de la integración de las rutas que regulan la transición floral

Estrés abiótico

A causa del cambio climático las plantas se enfrentan a un ambiente en perpetuo cambio y deben adaptar su crecimiento a unas condiciones volátiles para sobrevivir. Las temperaturas elevadas y el cultivo intensivo provocan una menor disponibilidad de agua y un aumento en la concentración de sal (NaCl) en el sustrato.

La combinación de estos tres elementos (altas temperaturas, sequía y alta salinidad) conlleva una reducción en la productividad de los cultivos y amenaza su supervivencia. Por lo tanto, es de vital importancia aprender sobre los mecanismos moleculares que permiten la tolerancia y adaptación al estrés.

Tal y como se encuentra revisado por Park et al., 2016, generalmente las plantas adelantan la inducción floral al verse sometidas a estrés. Esta inducción acelerada proporciona un beneficio biológico al asegurar la siguiente generación, aunque resulte en una menor producción de semillas (Wada & Takeno, 2010).

Salinidad

Las estrategias generales para la tolerancia a la salinidad incluyen la regulación de los componentes osmóticos e iónicos del estrés salino (Deinlein et al., 2014). Estas respuestas se desencadenan tras la detección del estrés, probablemente mediadas por la señalización del calcio, y específicamente a través del aumento de los niveles de Ca^{2+} libre en el citosol (Tracy et al., 2008). Cuando las raíces entran en contacto con altas concentraciones de sal en el suelo, las células vegetales activan la producción de osmolitos como la prolina para mantener la homeostasis osmótica (Székely et al., 2008). Posteriormente, las células vegetales logran excluir los iones Na^+ tóxicos del citoplasma para regular la homeostasis iónica, tanto en las raíces como en el tallo (Deinlein et al., 2014).

En la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, la señal de estrés se transmite a las células a través de un pico de Ca^{2+} que activa la vía de señalización SALT OVERLY SENSITIVE (SOS) (Park et al., 2016). Tras la percepción del pico de Ca^{2+} , el sensor de unión de iones

SOS3 forma un complejo con SOS2, una proteína quinasa de tipo serina/treonina, que activa el antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática SOS1, para la exclusión de Na^+ del citosol (Andrés et al., 2014; Shi et al., 2000, 2002). Además del desequilibrio de la homeostasis osmótica e iónica, el estrés salino también induce la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico, que causan daño oxidativo severo en las células vegetales debido a la peroxidación y desesterificación de los lípidos de la membrana (Baier et al., 2005).

Al final, las plantas estresadas experimentan senescencia prematura como consecuencia de la activación de enzimas que catalizan la descomposición de las clorofilas, lo que lleva a una fotosíntesis deteriorada y al amarillamiento de las hojas («An Insight into Aging, Senescence, and Their Impacts on Wound Healing», 2021; P. Lim, 2003; P. O. Lim et al., 2007; Scheumann et al., 1999). La mayoría de las plantas expuestas continuamente a alta salinidad mueren antes de la formación de semillas, ya que el choque salino conduce a la plasmólisis.

Sequía

En respuesta a la privación de agua, las plantas de *Arabidopsis* acortan su fase vegetativa y completan el ciclo de vida antes de que la sequía cause daños severos. Además de la floración acelerada, las plantas que adoptan la estrategia de escape de la sequía (DE) también aumentan el intercambio de gases y la capacidad fotosintética para proporcionar más nutrientes a las semillas en desarrollo. La respuesta DE depende del fotoperiodo y se basa en dos clases de activadores florales actuando aguas arriba de los integradores florales. En LDs, la proteína del reloj circadiano circadiano GIGANTEA (GI) regula al alza *FT* en condiciones de riego bajo (Riboni et al., 2013), mientras que la acumulación de la hormona de estrés ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA) activa reguladores positivos de *SOC1* (Andrés et al., 2014). Sin embargo, la respuesta DE parece estar inactiva bajo SDs, probablemente debido a la baja actividad de GI (Riboni et al., 2013) y el papel aun no del todo claro del ABA en la transición floral en este régimen de luz (Skubacz et al., 2016). Además, las plantas a menudo experimentan limitación de agua al crecer a temperaturas ambientales más altas, pero el efecto combinado de estos estresores ambientales en la

transición floral aún no está resuelto. Dado el creciente efecto perjudicial del cambio climático en la vida de las plantas, comprender cómo las GRN ajustan finamente el inicio del crecimiento reproductivo para maximizar la aptitud de la planta bajo diferentes estreses ambientales combinados es una tarea de investigación inaplazable para el futuro de la agricultura.

Relación entre estrés abiótico y la inducción floral

Otros reguladores negativos del crecimiento general pertenecen a la subfamilia de factores de transcripción (TFs) RAV. De hecho, las plantas transgénicas que sobreexpresan RAV1, RAV2 (también conocido como TEMPRANILLO2; TEM2), y el gen relacionado RAV2-like (también conocido como TEMPRANILLO1; TEM1) muestran defectos de crecimiento como enanismo y pérdida de dominancia apical (Castillejo & Pelaz, 2008; Fu et al., 2014). Las plantas sobreexpresoras de TEM (TEM-SE) exhiben alteraciones del desarrollo específicas, como floración extremadamente tardía bajo días largos inductivos (LD) y hojas glabras, debido a fuertes reducciones en la transcripción de diferentes objetivos directos, incluyendo los florigenos FLOWERING LOCUS T (FT) y TWIN SISTER OF FT (TSF1), y genes que codifican factores de iniciación de tricomas (Castillejo & Pelaz, 2008; Marín-González et al., 2015).

Últimas consideraciones

Para facilitar el estudio de las funciones de los genes de interés, tendemos a clasificarlos en rutas que podemos asociar a situaciones biológicas de interés. Esta es una limitación humana que impide reflejar la complejidad de la naturaleza. Así, aunque algunos genes se recogen dentro de la categoría de salinidad, sequía o temperatura, con toda seguridad las interacciones que se dan entre estas rutas son múltiples y las diferencias que hay en la respuesta a una u otra será posiblemente más de grado que cualitativa.

Objetivos generales

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido profundizar la conservación del papel de los genes *TEM1* y *TEM2* en la regulación de la inducción floral; concretamente en relación con el efecto que el estrés abiótico ejerce sobre la inducción floral.

A continuación, se describen los objetivos que se han planteado para esta investigación:

1. Analizar el papel de los genes *TEM* en la regulación de la inducción floral en la respuesta a la presencia de salinidad y sequía, y determinar su interacción genética con los genes *MYC*, *GI* y *SVP*.
2. Analizar el grado de conservación de la función de los genes *TEM* en la planta basal *Selaginella moellendorffii*.
3. Analizar los patrones de expresión de los genes *RAV* del helecho *Ceratopteris richardii*

Resultados

Estudios de la función de TEM en la respuesta a estrés abiótico.

Rol de TEM en salinidad

El transcriptoma de las plantas que sobre-expresan TEM presentan alteraciones en la regulación de genes relacionados con el estrés abiótico.

Con la intención de identificar las rutas que pudieran estar detrás del efecto que TEM ejerce sobre la fisiología de la planta, analizamos los cambios transcriptómicos que ocurren entre plantas *TEM1-SE* y plantas salvajes a través de secuenciación de RNA (RNA-seq).

En torno a 3000 genes se encuentra diferencialmente expresados entre las plantas salvajes y las plantas *TEM1-SE* ([Datos S1](#)). De estos, el número de genes sobre-expresados respecto de las plantas WT es ligeramente superior al número de genes inhibidos (1625 presentan mayor expresión en las plantas *TEM1-SE* que en las plantas WT, un 54%; frente a 1372 genes que presentan una expresión inferior en las plantas *TEM1-SE* que en las plantas WT, un 46%).

Mediante un análisis de enriquecimiento pudimos identificar que en las plantas *TEM1-SE* se encuentran inhibidas varias rutas relacionadas con el crecimiento y rutas asociadas a la respuesta a estímulos internos, particularmente la respuesta a una hormona relacionada con la respuesta a estrés abiótico, el ácido jasmónico (JA). A su vez, también se identificaron rutas con mayor actividad que en las plantas WT como son las relacionadas a la privación de agua, también estrechamente relacionada con el estrés abiótico (Figura 8).

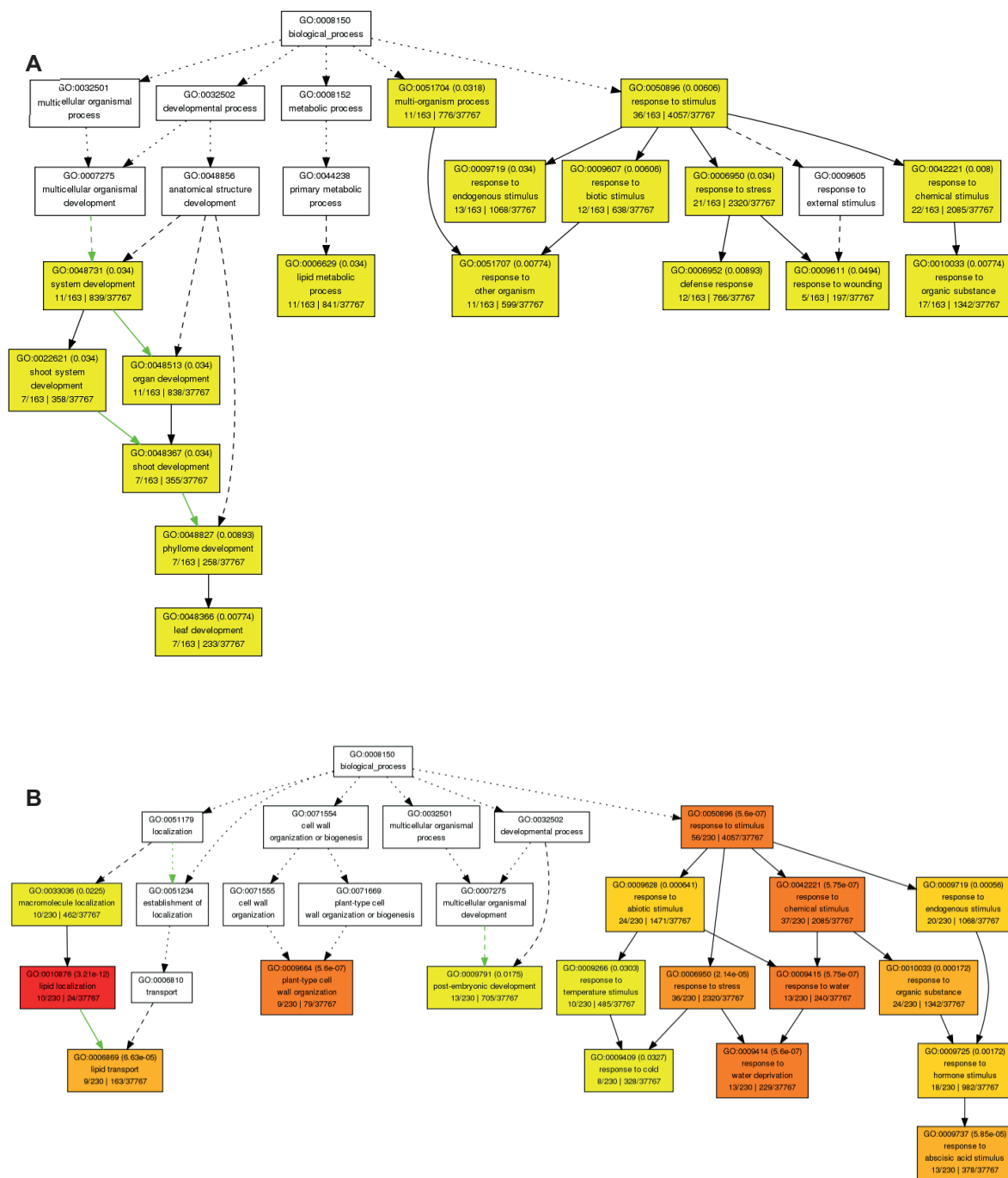


Figura 8 .Análisis de enriquecimiento de los genes diferencialmente expresados en TEM1-SE.

A). Enriquecimiento de categorías relacionadas con el desarrollo de plantas y respuesta de defensa basado en el análisis GO de genes inhibidos en TEM1-SE. B). Enriquecimiento de categorías relacionadas con la respuesta al estrés y la localización de lípidos basado en el análisis GO de genes sobre expresados en TEM1-SE.

La inhibición de los genes TEM provoca diferentes sensibilidades al estrés salino

Se ha descrito previamente que los factores de transcripción RAV juegan un doble papel en *Arabidopsis*. Por un lado, participan en el proceso de desarrollo de la planta y, por otro, en la respuesta a estrés abiótico (Castillejo & Pelaz, 2008; X.-H. Wang et al., 2014). En particular, podrían contribuir a la respuesta al estrés salino de manera independiente al rol de ABA durante la fase vegetativa (Fu et al., 2014).

En primer lugar, decidimos investigar el papel que podrían jugar los represores florales TEM en la respuesta al estrés salino. Para ello, analizamos el tiempo de floración de plantas mutantes *tem* en respuesta al aumento de la salinidad (50 y 100mM NaCl, para simular condiciones de salinidad moderadas y moderadas respectivamente) comparado con el de las plantas silvestres (WT).

Claramente, los mutantes *tem* presentan una mayor supervivencia que las plantas WT y las TEM-SE en respuesta al aumento de salinidad en el suelo (Figura 9, A, B).

El examen visual a las 4 semanas de desarrollo confirmó que el diámetro de las rosetas en las plantas WT disminuye en respuesta al aumento de concentración de sal (Figura 9, C), sin embargo, las plantas *tem*, cuya floración temprana conlleva el cese del crecimiento de las hojas de roseta, muestran una menor sensibilidad al estrés salino (Figura 9, B). No obstante, las plantas TEM-SE se muestran hipersensibles a la salinidad y muestran alteraciones en el color de las hojas de roseta, sugiriendo muerte celular en el mesófilo asociado a la senescencia (Figura 9, C).

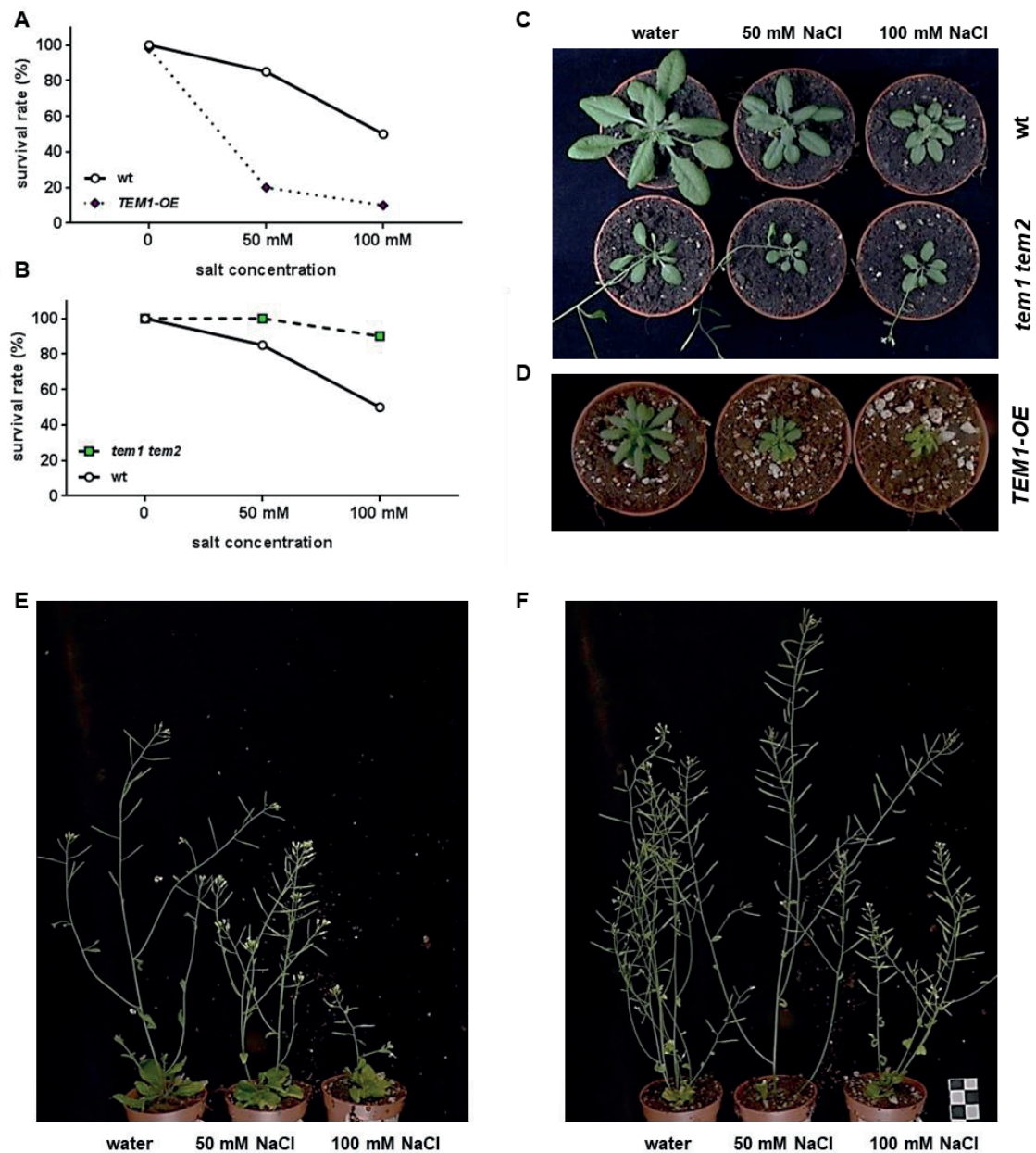


Figura 9. Respuesta al estrés salino de plantas cuya expresión de los genes *TEM* se encuentra alterada.

A y B), las líneas de los gráficos muestran la tasa de supervivencia de las plantas TEM-SE y de los mutantes *tem* cultivadas en LD y concentración de sal creciente en comparación a WT. La tasa de mortalidad fue calculada como el porcentaje de plantas muertas 4 tras cuatro semanas desde la germinación. C) Comparación fenotípica de plantas WT (arriba) y plantas *tem* (abajo) tras cuatro semanas de crecimiento en LD y diferentes tratamientos de salinidad. E y F) plantas WT y *tem* cultivadas durante 5 semanas en LD y regadas con agua (izquierda, control), o sometidas a un tratamiento de salinidad moderado (medio, 50mM NaCl) o alto (derecha, 100mM NaCl).

Tras 5 semanas del inicio del tratamiento de salinidad, las plantas WT muestran un claro retraso del crecimiento vegetativo y de la floración (Figura 9, D), mientras que la mayoría de las plantas *tem* fueron capaces de alcanzar la fase reproductiva pese a estar sujetas al tratamiento de salinidad de mayor intensidad (Figura 9, E, F). Así, los análisis fenotípicos sugieren que las plantas *tem* son menos sensibles a las concentraciones crecientes de NaCl y muestran un mayor éxito reproductivo que las plantas WT en estas condiciones.

Todo ello indicaría que los genes *TEM* podrían desempeñar un papel en respuesta a la salinidad.

Los genes TEM forman parte de la regulación de la transición floral en respuesta a estrés salino

Con el objetivo de investigar la posible relación entre el estrés salino y los represores de la inducción floral TEM se analizó el tiempo de floración de las plantas *tem* en comparación con el tiempo de floración de las plantas WT en respuesta a concentración de salinidad creciente.

En condiciones de SD, las plantas WT tratadas con concentraciones bajas y moderadas de NaCl no llegaron a alcanzar la fase reproductiva, mientras que los mutantes *tem*, de floración temprana, tratadas con concentraciones bajas, alcanzaron la madurez reproductiva al mismo tiempo que en condiciones control (Figura 10, A).

Por otro lado, en condiciones de LD, las plantas WT sometidas a estrés salino leve florecieron más tarde que las plantas no tratadas, mientras que la mitad de las plantas WT sometidas a estrés salino alto murieron antes de que se diera la transición floral (Figura 10, B). Por el contrario, los mutantes *tem* únicamente mostraron una ligera inhibición del crecimiento, manteniendo la floración dentro de las tres semanas tras la germinación, con un promedio de 6 hojas de manera independiente al tratamiento (Figura 10, B)

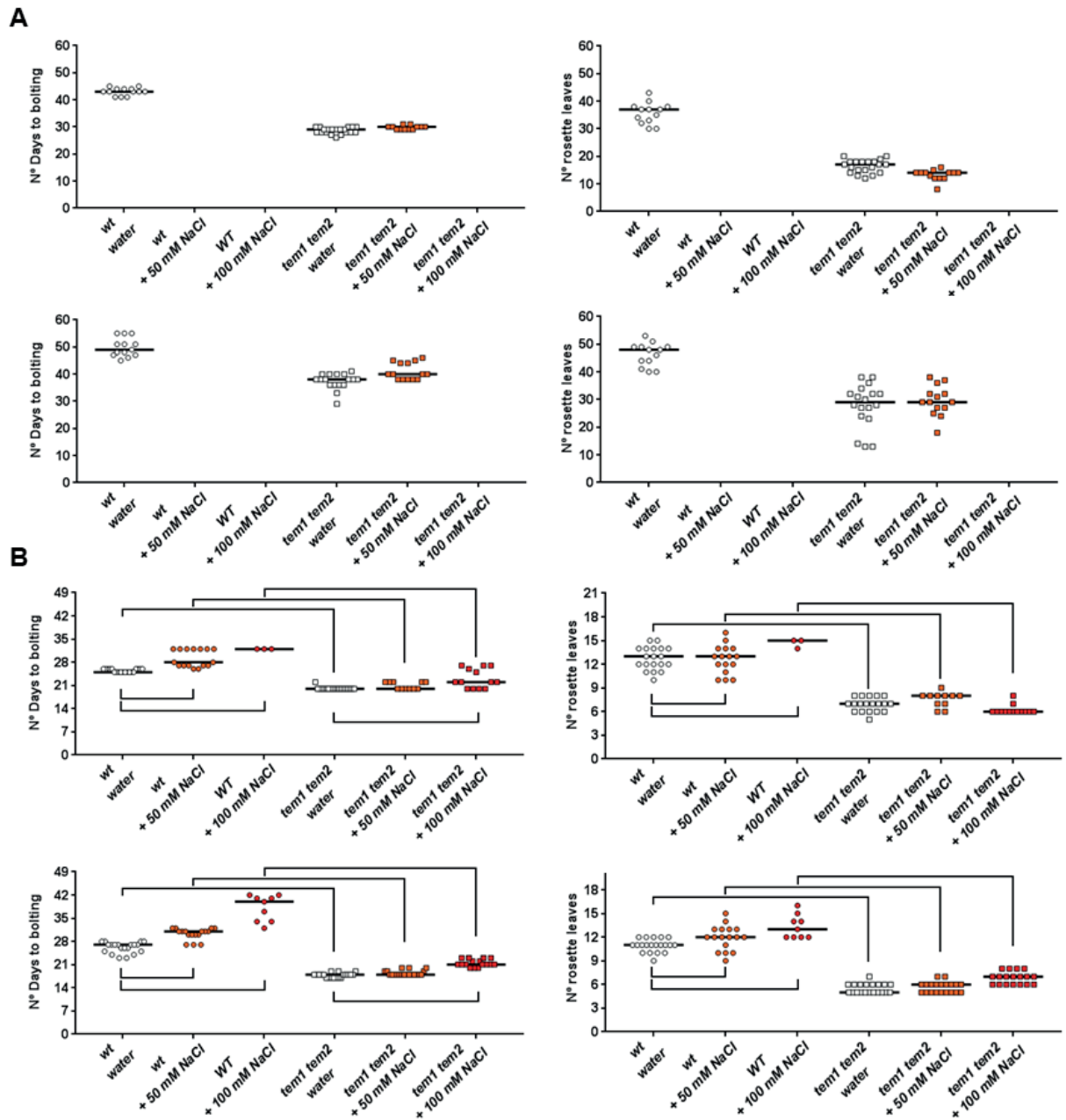


Figura 10. Efecto de la salinidad sobre la transición floral en condiciones de SD y LD

A y B) Floración bajo SD y LD respectivamente, medido como número de días hasta la aparición de la inflorescencia (izquierda) y número de hojas de roseta (derecha) en plantas WT y tem sujetas a tratamientos de salinidad en comparación a plantas no tratadas. Se muestran dos réplicas biológicas.

Cabe destacar que la mayoría de los mutantes *tem* también produjo flores bajo el tratamiento de salinidad más alto en condiciones de LD (Figura 10, B). Así, la reducción de la sensibilidad de las plantas *tem* al estrés salino durante la transición floral sugeriría que los genes *TEM* podrían mediar en el retraso en el cambio de fase vegetativa a reproductiva en respuesta a salinidad observado en las plantas WT. Esto se ve apoyado por la acumulación de ARNm de *TEM1* y *TEM2* durante la fase vegetativa (Figura 11, A). Sin embargo, no se detectaron alteraciones en los niveles de ARNm del activador floral CONSTANS (CO, (Putterill et al., 1995)) en nuestras condiciones experimentales (Figura 11, B).

Para investigar a fondo la base molecular de la reducción de la sensibilidad a estrés salino de los mutantes *tem* se analizó el cambio en la transcripción de los genes que actúan posteriormente a los TEM en plantas cultivadas en LD durante una semana. La expresión de *FT* y *TSF* disminuyó a medida que la concentración de salinidad aumenta en ambos genotipos, pero se encontraron niveles más altos de transcritos de los florígenos (*fold change* = 4) en los mutantes *tem* en todas las condiciones (Figura 11, C).

En el mismo sentido, se observó una sobreexpresión del gen responsable de la biosíntesis GA (GA3OX1) y del integrador floral SOC1 en las plantas *tem* (*fold change* = 2) tanto en condiciones control como en condiciones de salinidad (Figura 11, D).

Por lo tanto, los análisis fenotípicos y los de expresión indican una correlación entre el fenotipo de floración temprana y la ausencia de represión de los integradores florales y de los genes asociados a la biosíntesis de GA en plantas *tem* con independencia del tratamiento de salinidad.

En conclusión, estos resultados muestran que el ciclo de vida más corto de las plantas mutantes da lugar a un éxito reproductivo frente a las plantas WT ya que son capaces de completar la fase reproductiva incluso en condiciones de alto estrés salino.

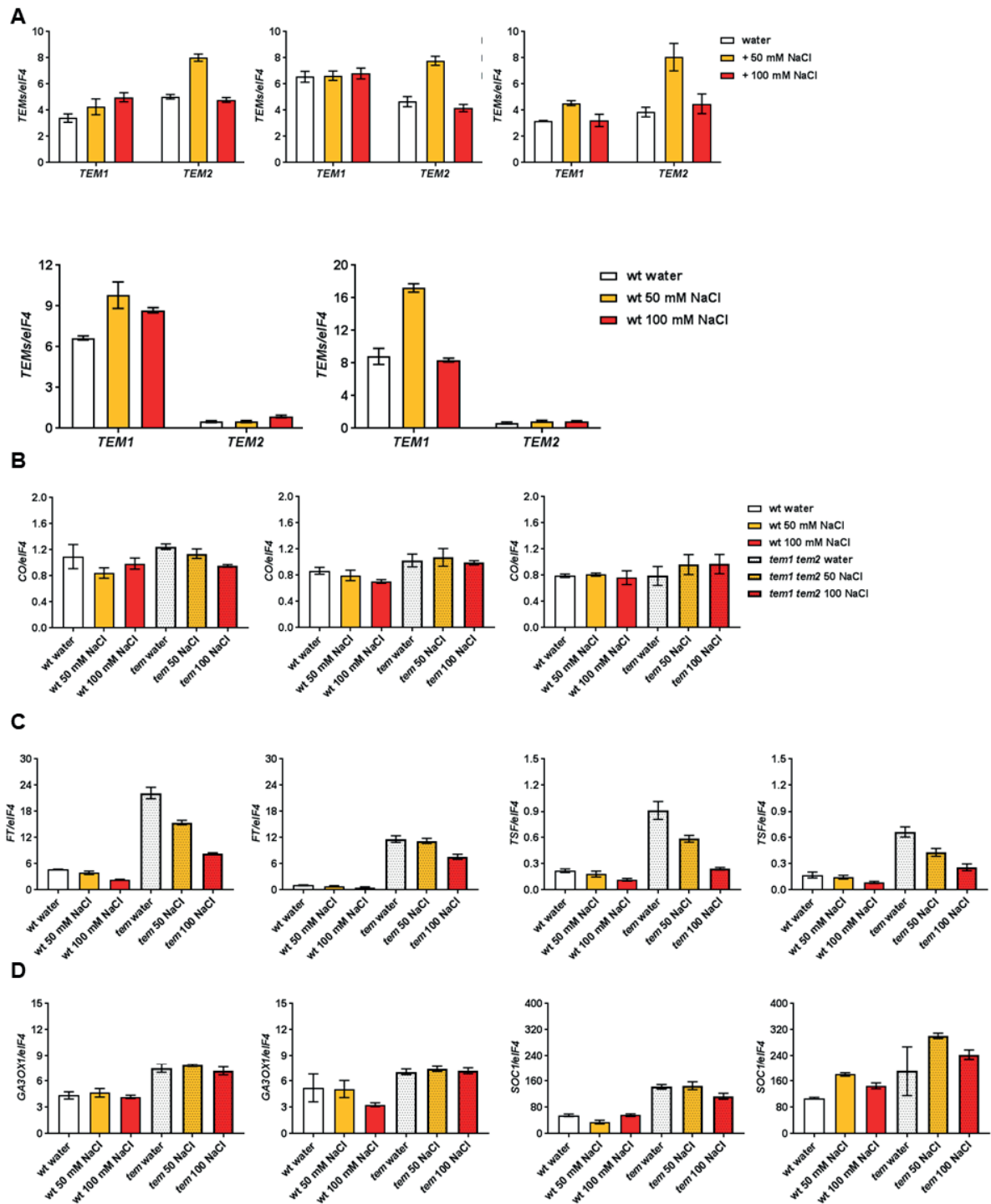


Figura 11. Análisis de expresión de genes reguladores de la transición floral

A). Réplicas de expresión de los genes *TEM1* y *TEM2* en plantas cultivadas durante una semana (arriba) y dos semanas (abajo) bajo LD y sometidas a tratamientos de concentración creciente de salinidad. B-D) Réplicas biológicas de RT-qPCR del inductor floral *CO* (B), los integradores florales *FT/TSF1* (C) y *GA3OX1* y *SOC1* en plantas WT y *tem* cultivadas durante una semana en LD en condiciones control frente a tratamientos de salinidad.

El estrés salino tiene un menor impacto sobre el crecimiento en las primeras etapas del desarrollo en las plantas tem en condiciones de salinidad

La germinación es un proceso fisiológico altamente afectado por la presencia de sal en el medio. Para comprobar el efecto del estrés salino en la germinación de los mutantes *tem* se realizó un seguimiento de la aparición de la radícula a partir de semillas embebidas en medio con niveles bajos e intermedios de NaCl.

Como era esperado, la tasa de germinación disminuyó con el incremento de la concentración de sal tanto para las semillas WT como para las *tem* (Figura 12, A, B).

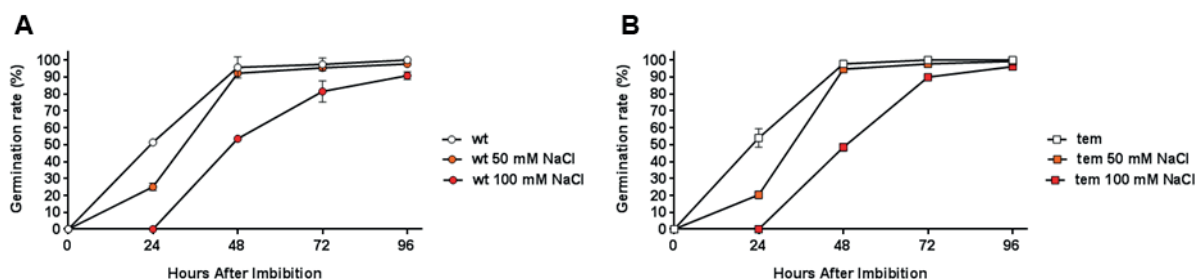


Figura 12. Efecto de la salinidad en la germinación de plantas TEM

A y B). Tasa de germinación de las plantas WT y *tem* en medio MS con concentraciones crecientes de sal (50mM en naranja, 100mM en rojo) con relación al control (blanco). Las medidas fueron tomadas cada 24h desde el momento de la imbibición como porcentaje de semillas que mostraban la protrusión de la radícula. Para cada punto se utilizaron 80 semillas y el dato representa la media con el ESM de tres replicas independientes.

Ambos genotipos se comportaron de manera similar, con excepción de la muestra tomada a los tres días después de la imbibición y a 100mM NaCl, donde *tem* mostró un porcentaje mayor de semillas germinadas. Esta observación concuerda con los propuesto por trabajos previos en los que se muestra que la germinación de las semillas en respuesta a estrés salino se encuentra activada en mutantes *rav* e inhibida en plantas sobre-expresantes *RAV1* y *RAV1-like* y, en menor medida, *RAV2* (Fu et al., 2014).

En trabajos previos del laboratorio ya se había observado un aumento de GA en las plantas mutantes *tem* (Osnato et al., 2012) y este hecho podría estar relacionado con el aumento de la capacidad para germinar de estas semillas. En este sentido, observamos un aumento en la expresión de *ABI5* y una disminución de la expresión de *GA3OX1*, reguladores negativo y positivo de la germinación de las semillas (D. H. Kim et al., 2008; Skubacz et al., 2016), en respuesta a las concentraciones crecientes de salinidad comparado con la ausencia de tratamiento (Figura 13, A).

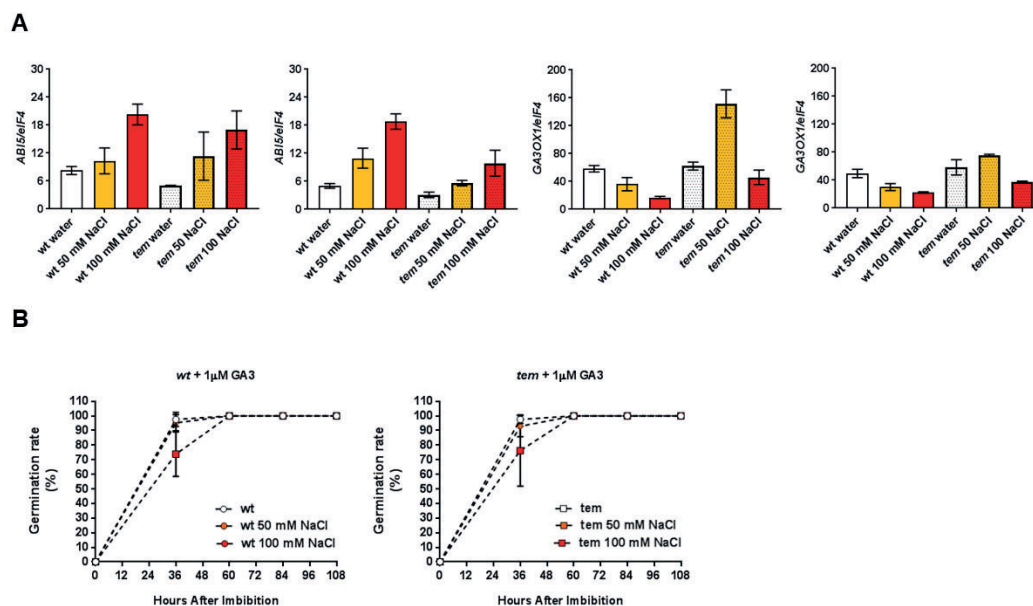


Figura 13. Efecto de la salinidad en la germinación y primeras fases del desarrollo

A), Análisis de expresión de *ABI5* y *GA3OX1* en plantas WT y *tem* en semillas tras dos días de la germinación en condiciones de LD. Se muestran los resultados de dos réplicas biológicas. B), tasa de germinación de plantas WT y *tem* sembradas en medio MS con concentraciones crecientes de salinidad suplementadas con 1 μ M GA₃ contra control.

En este mismo sentido, la administración de 1 μ M GA₃ al medio es suficiente para recuperar las tasas de germinación de las plantas WT en medio salino al nivel de las plantas WT no tratadas, indicando que la acumulación de GA₃ propia de los mutantes *tem* podría estar detrás de su resistencia a la salinidad en cuanto a la germinación (Figura 13, B).

A continuación, se analizaron los efectos inhibitorios de la salinidad sobre el crecimiento de las plántulas WT y *tem* y se pudo apreciar una reducción tanto en el desarrollo de la raíz como en la expansión de los cotiledones en ambos genotipos (Figura 14).

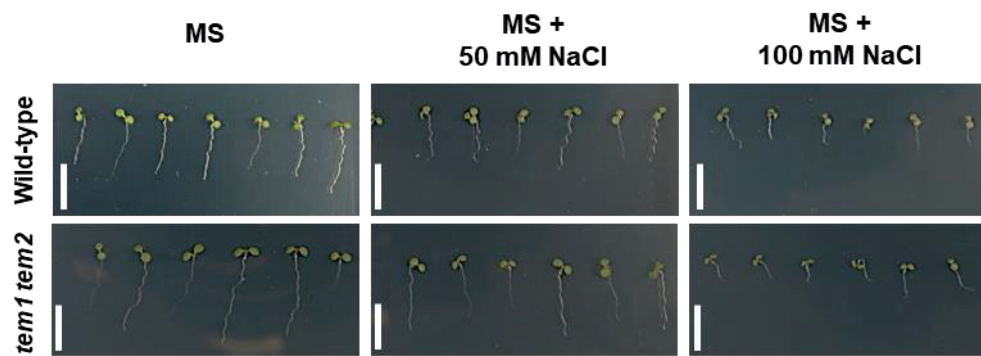


Figura 14. Efecto de la salinidad en el desarrollo de las primeras fases del ciclo vital

Desarrollo de la raíz primaria y expansión de los cotiledones en plantas WT (arriba) *tem* (abajo) cultivadas durante 7 días en medio MS (izquierda) y MS suplementado con 50mM NaCl (medio) y 100mM NaCl (derecha).

A pesar de encontrar una alta variabilidad entre réplicas biológicas, también se encontró un aumento estadísticamente significativo en la longitud de la raíz primaria en plántulas *tem* una semana tras la germinación (Figura 15, B) pero no en el diámetro de los cotiledones (Figura 15, C). Además, el peso fresco de las plántulas sometidas al tratamiento de salinidad mostró que, pese a la correlación negativa entre la acumulación de biomasa y la concentración de salinidad, los mutantes *tem* acumulan una mayor biomasa relativa a la ausencia de tratamiento que las plantas WT (Figura 15, A), mostrando una menor sensibilidad que las plantas WT.

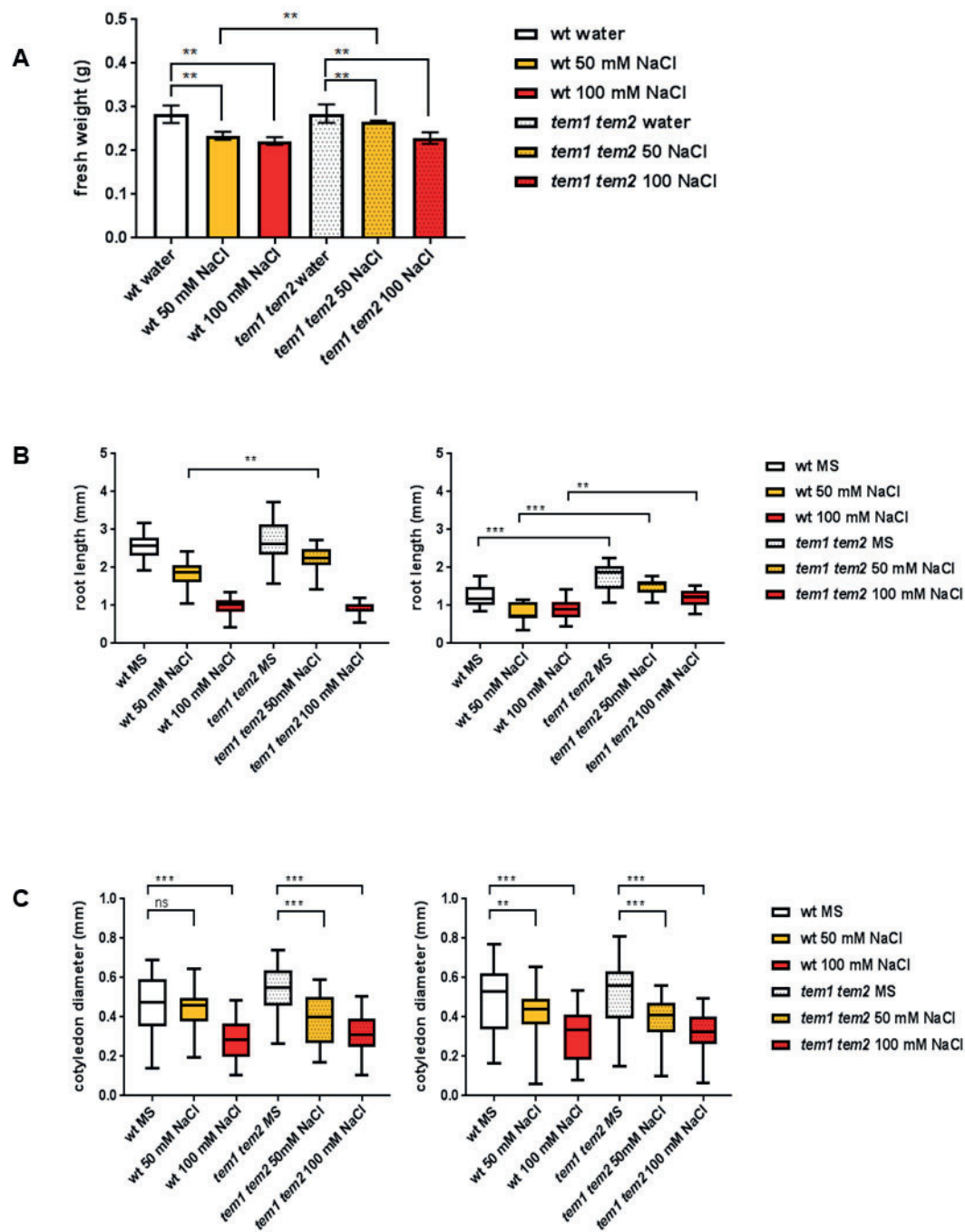


Figura 15. Efecto de la salinidad sobre la germinación y el desarrollo de las plántulas.

A), Grafico de barras de la acumulación de biomasa de las plantas WT y *tem* tratadas con concentraciones de sal en comparación al control. B), Desarrollo de la raíz primaria en plantas WT y *tem* tras 7 días de desarrollo en placas MS. C) Desarrollo de los cotiledones en plantas WT y *tem* tras 7 días de desarrollo en placas MS. Las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test t de student se muestran con * si $P < 0.033$ y ** si $P < 0.02$.

Teniendo en cuenta las diferencias de desarrollo entre las plantas WT y las plantas mutantes *tem*, se observa que las plántulas *tem* son ligeramente menos sensibles que las WT al aumento de la salinidad durante la fase juvenil del desarrollo.

Los mutantes tem presentan son más resistentes a la senescencia inducida por la salinidad

En el laboratorio se había descrito que los mutantes *tem* acumulan un mayor nivel de GA₄ bioactivo (Matías-Hernández et al., 2016; Osnato et al., 2012), lo que podría compensar el retraso en el crecimiento inducido por la salinidad. Esto, junto a un menor nivel de acumulación de JA (una fitohormona lipídica involucrada en la respuesta al estrés y en diferentes procesos del desarrollo y, en concreto, de la senescencia foliar (He et al., 2002)), sugiere que el contenido hormonal alterado de los mutantes *tem* podría otorgarles una ventaja al enfrentar el estrés abiótico.

Por ello, se seleccionaron una serie de genes en función de su papel conocido en la senescencia y de su desregulación en TEM-SE para estudiar su respuesta a salinidad en plantas mutantes *tem*.

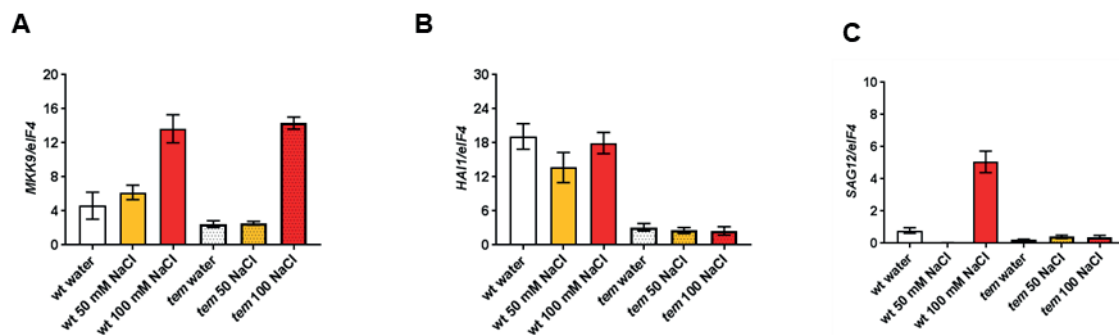


Figura 16. Patrones de expresión de MKK9, SAG13 y SAG12

A), B) y C). Resultados de RT-qPCR de MKK9, SAG13/HAI1 y SAG12 respectivamente para plantas WT y *tem* cultivadas en LD durante 2 semanas en condiciones de salinidad creciente.

Estos análisis revelaron una reducción de la expresión de *MKK9* (inductor de la senescencia (C. Zhou et al., 2009)) bajo estrés salino leve (Figura 16, A), así como de *SAG13* y *SAG12* en las tres condiciones en plantas *tem* en comparación con las plantas

WT (Figura 16, B, C). SAG12 y SAG13 son dos proteínas de actividad proteolítica fuertemente ligadas al proceso de envejecimiento y senescencia foliar (Y.-S. Noh & Amasino, 1999).

En resumen, los análisis moleculares de las plantas sometidas a estrés salino indican que la inhibición de los genes relacionados con la síntesis de JA y SAGs en las plantas *tem* podría estar retrasando los procesos de senescencia asociados a la presencia de salinidad en el sustrato. Por lo tanto, los TEM podrían actuar en la regulación positiva de la senescencia foliar, además de en la regulación negativa del crecimiento de la planta.

Los mutantes tem toleran mejor el estrés oxidativo inducido por la salinidad

Entre los efectos que el estrés abiótico provoca en la fisiología de las plantas, encontramos la generación de radicales libres, especialmente aquellos derivados del oxígeno que conducen a daños serios en la membrana celular, interrupción de los flujos iónicos y defectos en el proceso de fotosíntesis. La producción excesiva de estas sustancias ROS contribuye a la aceleración de la senescencia foliar, que se encuentra mediada, entre otros genes, por *MKK9* (C. Zhou et al., 2009). Dado que este gen se encuentra sobre expresado en plantas TEM1-SE, se decidió analizar el estado oxidativo de estas plantas.

Para ello, se realizó una tinción con diaminobencidina (DAB) tanto en las plantas TEM1-SE como *tem*, permitiendo detectar las sustancias ROS acumuladas.

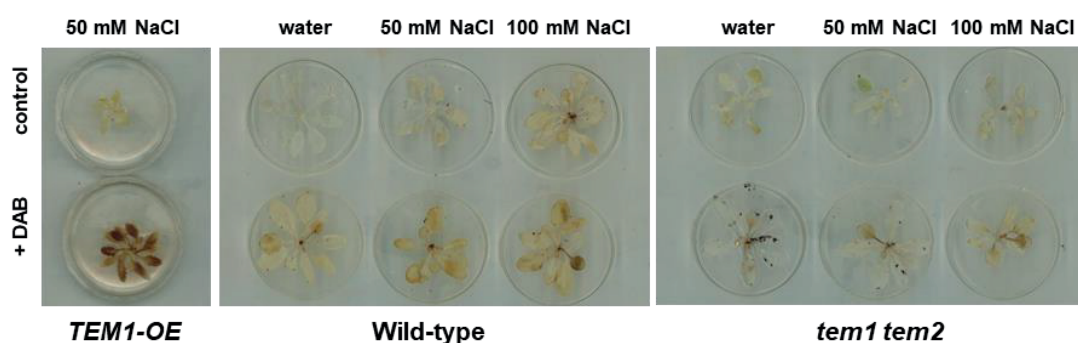


Figura 17. Análisis de la acumulación de la sustancias ROS en plantas sometidas a senescencia inducida por estrés salino

Tinción DAB de H₂O₂ tras 4 semanas de tratamiento. Las plantas fueron cultivadas en LD y tratadas con concentraciones crecientes de salinidad.

Pese a hallar altos niveles de H_2O_2 en las hojas más viejas de todos los genotipos, las plantas tratadas con sal presentan niveles más altos que las plantas no tratadas, confirmando la inducción de especies ROS en respuesta a salinidad. Además, los resultados confirman que la producción de especies ROS es superior en las plantas TEM1-SE que en las plantas WT (Figura 17).

Por el contrario, la acumulación de especies ROS es menor en los mutantes *tem*. Indicando que los mutantes estarían mejor preparados para tolerar el estrés oxidativo inducido por la presencia de salinidad.

Los mutantes tem muestran una degradación alterada de pigmentos y cinéticas de NPQ (Quenching no fotoquímico) en respuesta a salinidad.

Los procesos de senescencia vienen indicados por una degeneración de los cloroplastos y sus pigmentos fotosintéticos (Kuai et al., 2018). Al medir el contenido de clorofilas y carotenoides en las plantas WT y *tem* sometidas a salinidad, descubrimos que, aunque las plantas mutantes muestran un menor contenido de pigmentos bajo condiciones control, el contenido total de estos pigmentos disminuyó con mayor rapidez en las plantas WT que en las plantas *tem* en respuesta a estrés salino (Figura 18, A, B)

Dado que las plantas inician una senescencia prematura para librarse de aquellas hojas que no son eficientes fotosintéticamente, llevamos a cabo una evaluación del rendimiento fotosintético mediante una tecnología de fenotipado no-invasiva (IMAGIN-PAM). Concretamente, calculamos el factor de NPQ (del inglés Non-Photochemical Quenching), un mecanismo fotoprotector desarrollado para librarse del exceso de luz que pueda ser dañino para los complejos foto-receptores en forma de calor (Ruban, 2016).

Bajo condiciones control los dos genotipos presentan un comportamiento similar: el NPQ continúa incrementando durante la exposición a luz actínica y adquiere su máximo valor tras 9 minutos de exposición (Figura 18, C-E). En respuesta a salinidad los dos genotipos muestran un perfil cinético diferente: las plantas WT adquieren unos valores superiores a los de los mutantes *tem* (Figura 18, C-E). Es más, el NPQ no cambia en las plantas mutantes sometidas a altas concentraciones de sal respecto de su control, lo que nos invita

a pensar que las plantas *tem* podrían, o bien tener un NPQ menos eficiente, o, por el contrario, experimentar un estrés menor que las plantas WT.

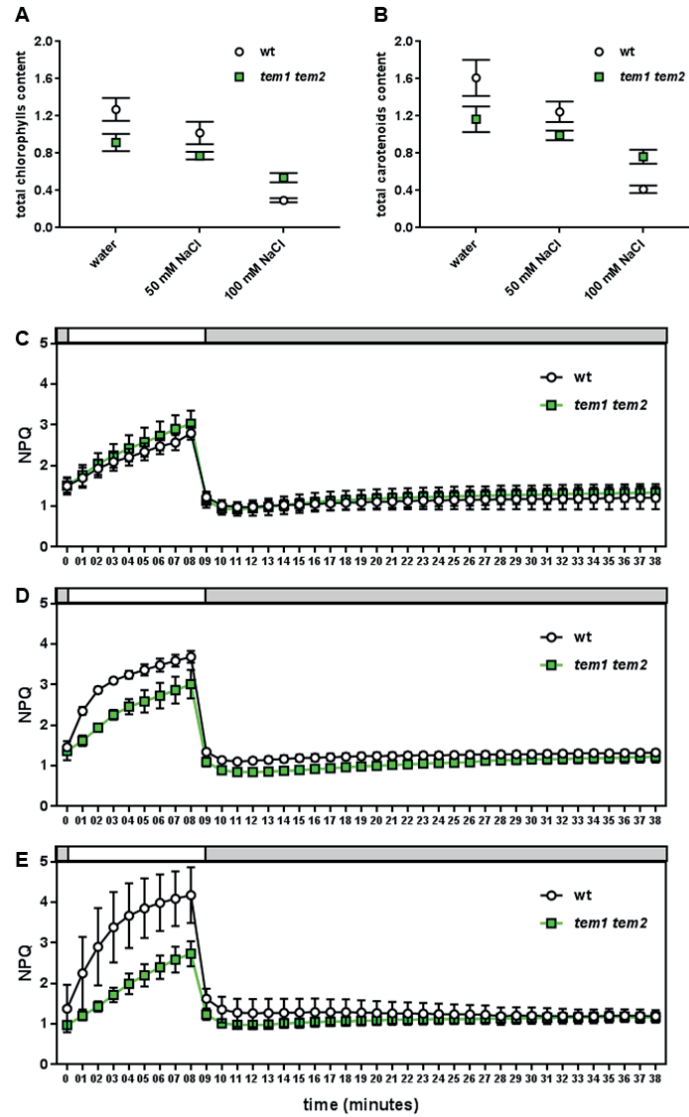


Figura 18. Análisis de la senescencia asociada a marcadores fisiológicos y mecanismos fotoprotectores en respuesta a estrés salino.

A, B) representación de la degradación de clorofila y carotenoides medidas como el contenido total de pigmentos fotosintéticos a 4 semanas tras la germinación en plantas WT y *tem* cultivadas en LD y concentraciones crecientes de sal. C-E) Gráficos de dispersión superpuestos con líneas conectivas que representan perfiles cinéticos de NPQ de plantas tipo salvaje (blancas) y plantas *tem1 tem2* (verdes) de 5 semanas de edad, cultivadas bajo condiciones de luz larga en condiciones sin estrés salino (C), estrés salino moderado (D) y estrés salino alto (E). NPQ se calculó como $(F_0 - F_m)/F_m$ en diferentes puntos temporales. Barra blanca, fase de inducción y fase estable con luz actínica; barra gris, fase de relajación en la oscuridad. Se utilizó la prueba t de dos colas e independientes para evaluar las diferencias significativas entre los dos genotipos, con * $P < 0.0033$, ** $P < 0.0002$, *** $P < 0.0001$.

Rol de *TEM* en sequía

La proteína TEM1 interactúa con MYC2 tanto en células de levadura como en células vegetales.

No se han descrito dominios específicos para la interacción proteína-proteína en las proteínas de la familia RAV y se consideraba que regulan la transcripción como monómeros (Kagaya et al., 1999) . Sin embargo, está descrito que los TEMs de *Arabidopsis* se asocian físicamente con el activador floral GI en protoplastos de tabaco (Sawa & Kay, 2011), con los co-represores TOPLESS (TPL) y TPL Related (TPR) en levadura (Causier et al., 2012), y con la histona metiltransferasa CURLY LEAF (CLF) en planta (Hu et al., 2021).

Con anterioridad a mi llegada al laboratorio y con el objetivo de identificar posibles interactores de los TEM, se analizó una biblioteca de cDNA de genes expresados en diferentes tejidos de plantas de *Arabidopsis* usando TEM1 y TEM2 como cebos en ensayos de Yeast 2-Hybrid (Y2H). Tras la secuenciación de casi cien colonias, un subconjunto de interactores putativos fue seleccionado en base a su función biológica en procesos de desarrollo, localización nuclear y perfil de expresión solapante con los TEM. Entre todos los candidatos interesantes, se eligió al regulador de la transcripción MYC2 para análisis posteriores, ya que el gen parecía estar altamente transcrito en tejidos vegetativos al final del día (Figura 19, A-D) y codifica un represor floral que actúa directamente sobre FT (H. Wang et al., 2017).

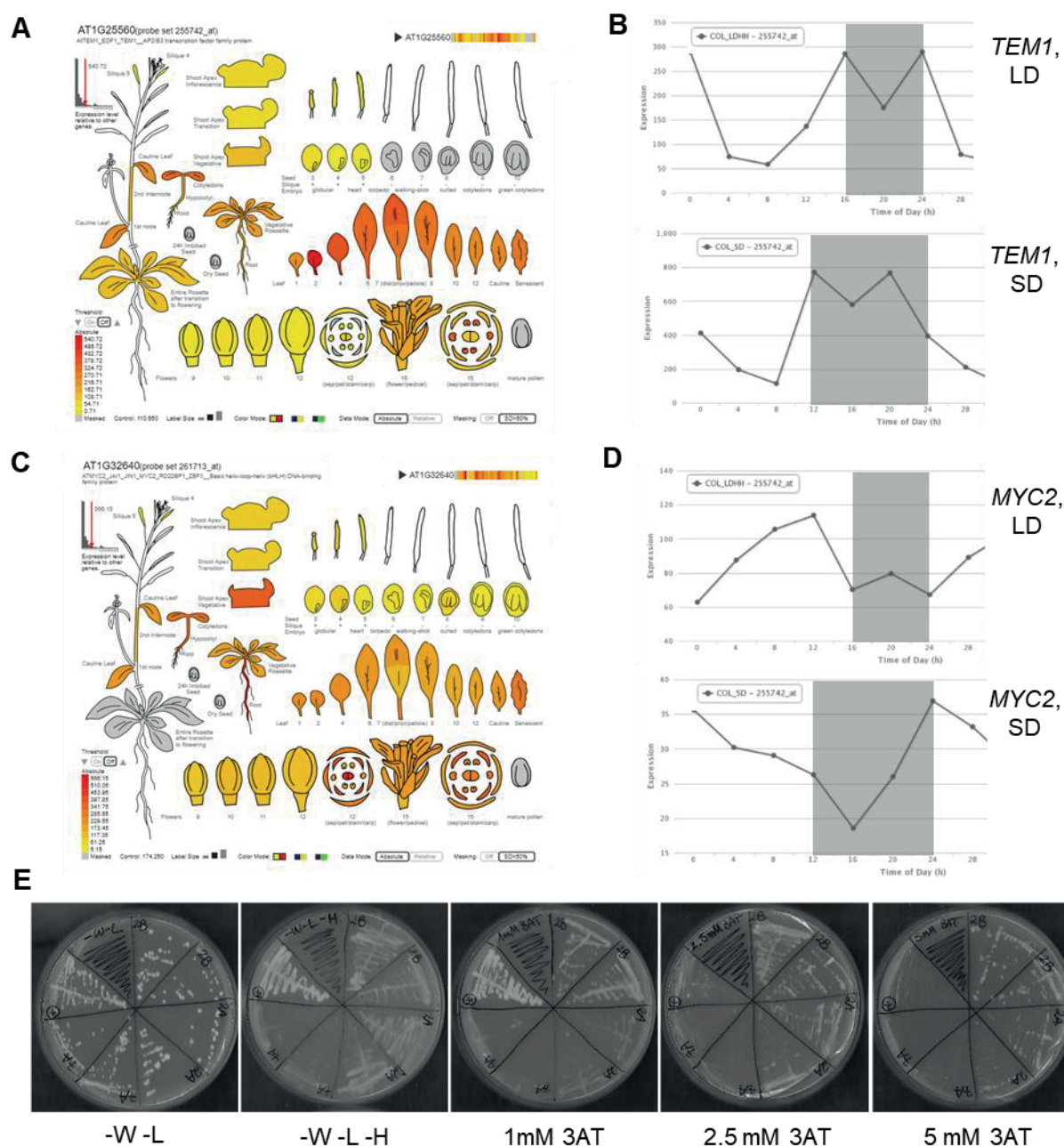


Figura 19. Análisis preliminares de la posible interacción de *MYC2* y *TEM1*

A-D) análisis *in silico* de la expresión de *TEM1* y *MYC2* en el que se muestra el solapamiento de las áreas de expresión a lo largo del desarrollo. A, C) oscilación de los patrones de expresión, mostrando un incremento durante la tarde en LD y en la noche en SD. B, D y E) Validación de la interacción proteína-proteína mediante Y2H.

La interacción entre TEM1 y MYC2 fue validada en células de levadura usando Y2H (Figura 19, E) y en células vegetales usando la Proteína Fluorescente Amarilla dividida (YFP). En ensayos de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC), se observó una señal fluorescente clara de YFP reconstituido en núcleos de hojas de *Nicotiana benthamiana* co-expresando YFP^N-MYC2 y YFP^C-TEM1 así como YFP^N-MYC3/YFP^N-MYC4 y YFP^C-TEM1 (Figura 20 ,A), pero no en células transformadas con controles negativos (Figura 21, A).

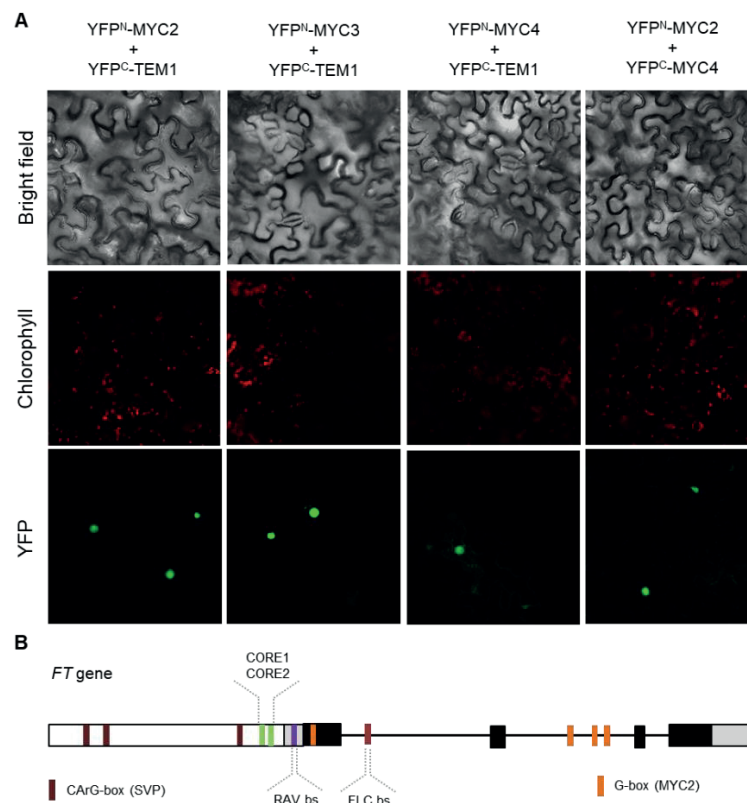


Figura 20. Ensayos BiFC para la Interacción in vivo entre TEM1 y MYCs.

A) Ensayos de BiFC mostrando que TEM1 interactúa con proteínas MYC. Fluorescencia YFP detectada en núcleos de células de hojas de *N. benthamiana* co-infiltradas con cepas de *Agrobacterium* expresando proteínas MYC completas fusionadas al fragmento N-terminal de YFP (YFP^N-MYC2, YFP^N-MYC3, YFP^N-MYC4) y TEM1 fusionado al fragmento C-terminal de YFP (YFP^C-TEM1). Los controles negativos se proporcionan en la Figura 21, la interacción conocida entre MYC2 y MYC4 fue utilizada como control positivo. Arriba, campo claro; medio, clorofila; abajo, fluorescencia YFP. B) Representación esquemática del locus FT (promotor en blanco; regiones no traducidas 5' y 3' en gris; exones en negro; intrones, línea). La región promotora contiene secuencias de consenso unidas por SVP (cajas CArG en -1215 bp, -1114 bp y -342 bp) y CO (CORE1 en -223 bp, CORE2 en -164 bp). El cuerpo del gen contiene el sitio de unión de TEM en el UTR 5' (RAV bs en -37 bp), el sitio de unión de FLC en el primer intrón (FLC bs a +287 desde ATG), y cajas G centrales a las que se une MYC2 en el primer exón (+49 bp desde ATG) y tercer intrón.

A pesar de la alta similitud de secuencia entre las proteínas TEM1 y TEM2 (71,27%), no fue observada ninguna interacción en levaduras entre TEM2 y las proteínas MYC y solo se pudo observar señal de manera esporádica en células de *N. benthamiana* co-expresando YFP^N-MYC2 y YFP^C-TEM2 (Figura 21, B y C). No se detectó asociación entre MYC2 y SVP (Figura 21, D), otro represor floral que regula a FT uniéndose a su promotor. Así, el ensayo BiFC indicó interacciones moleculares más fuertes entre TEM1 y las proteínas MYC.

La presencia de sitios de unión RAV y bHLH en una región cercana al ATG de FT (Figura 20, B) abrió la puerta a investigar si TEM1 y MYC2 se unen en conjunto a elementos específicos involucrados en la represión transcripcional del florígeno. Esta región regulatoria también contiene dos Elementos de Respuesta a CO (CORE1, CORE2) que son esenciales para la activación transcripcional de *FT* (Tiwari et al., 2010). Por lo tanto, TEM1-MYC2 podría regular la expresión de *FT* compitiendo con CO (como previamente fue propuesto por (Castillejo & Pelaz, 2008), o alternativamente interfiriendo con la maquinaria transcripcional central (descrito por (Gaston & Jayaraman, 2003) en regiones 3' del Sitio de Inicio de Transcripción (TSS), una región también reconocida por el potente represor FLC (Helliwell et al., 2006).

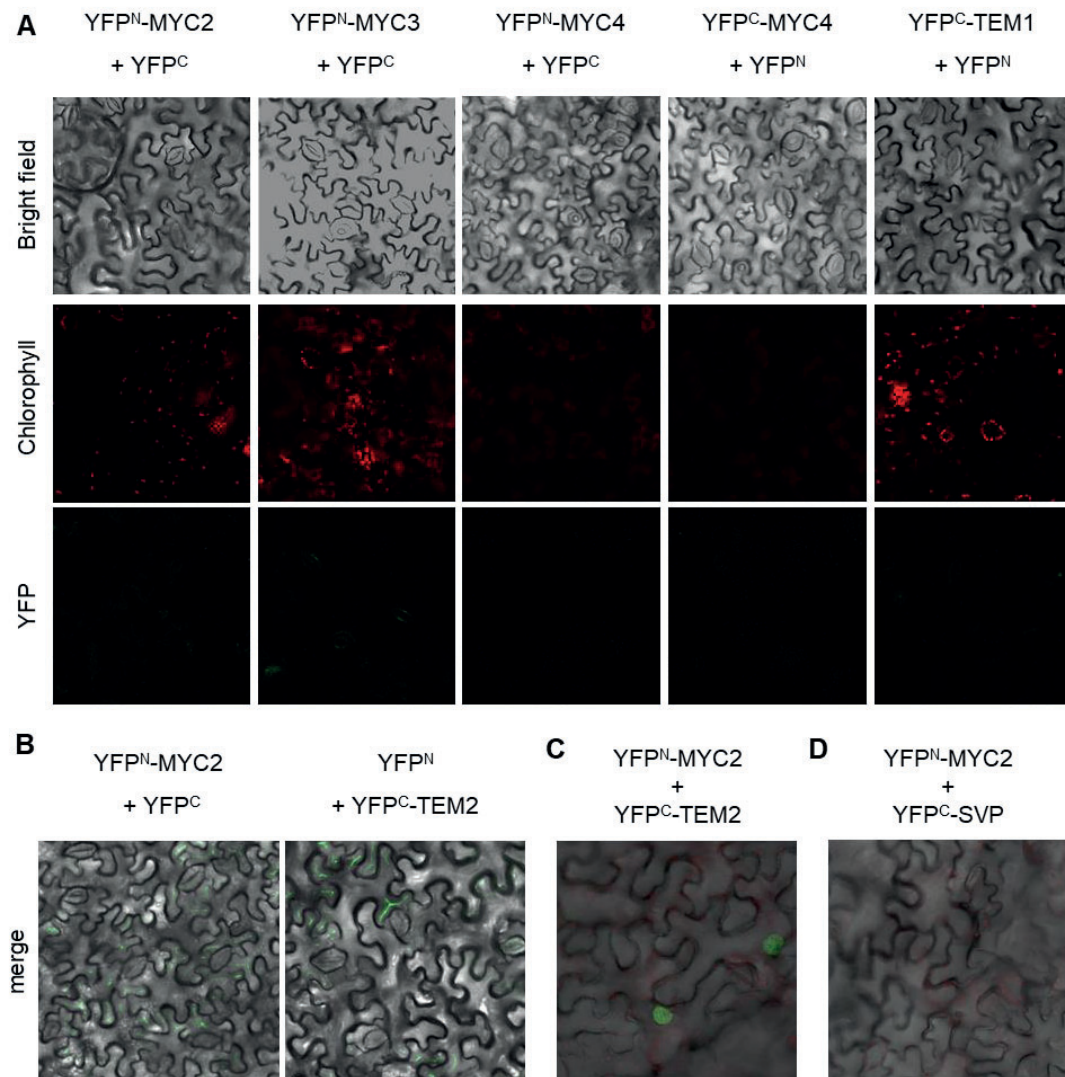


Figura 21 Ensayos BiFC para la interacción uno a uno de represores florales

A) Células de hojas de *N. benthamiana* expresando combinaciones de proteínas de fusión N-terminal (YFP^N-MYC2, YFP^N-MYC3, YFP^N-MYC4) o proteínas de fusión C-terminal (YFP^C-MYC4, YFP^C-TEM1) con YFP^C y YFP^N respectivamente. Se utilizaron vectores vacíos como controles negativos. Arriba, campo claro; medio, clorofila; abajo, fluorescencia YFP. B) Células de hojas de *N. benthamiana* expresando transitoriamente la longitud completa de MYC2 y TEM2 fusionados a los fragmentos N-terminal y C-terminal de YFP, respectivamente. C y D, imágenes mostrando que YFP^N-MYC2 interactúa débilmente con YFP^C-TEM2 (C) pero no con YFP^C-SVP (D). Fusión, superposición de fluorescencia y campo claro.

Los TEMs y los MYCs interactúan genéticamente durante el desarrollo vegetativo y reproductivo.

Tras establecer la interacción física, se puso a prueba su relevancia biológica. Para ello y dada la redundancia funcional entre TEM1/TEM2 (Matías-Hernández et al., 2016; Osnato et al., 2012) y MYC2/MYC3/MYC4 (Bao et al., 2019; H. Wang et al., 2017) en diferentes procesos del desarrollo, se generaron líneas mutantes quintuples *tem myc* para analizar sus fenotipos.

Cabe destacar que recientemente ha sido publicado que la floración temprana de los mutantes *myc* se ve potenciada por una mutación no identificada hasta el momento que afecta a un residuo conservado de *COP1*, que reduce la degradación de CO (Yu et al., 2023). Esto condujo a la secuenciación de nuestro material y reveló la presencia de la sustitución de G por A en *COP1*, que caracteriza la mutación *cop1-21* (Figura 22).



Figura 22. Detección del polimorfismo de nucleótido único *COP1* en fondos genéticos WT y *myc/tem*.

Detección del polimorfismo de nucleótido único *COP1* en fondos genéticos WT y *myc tem*. Alineamiento de secuencias que abarcan residuos del 640 al 660, incluyendo la mutación que causa la sustitución de S a N en el mutante *cop1-21* (arriba). Col-0 (WT) y *tem1 tem2* llevan el alelo tipo salvaje (A en la posición 1,943) mientras que *myc2*, *myc3 myc4 tem1 tem2* y *myc2 myc3 myc4 tem1 tem2* llevan el alelo mutante (G en la posición 1,943). El SNP fue detectado por secuenciación Sanger del ADN extraído de los genotipos indicados.

Encontramos el polimorfismo en los mutantes simples *myc2* y *myc3* (convirtiéndose en los mutantes dobles *myc2 cop1-21* y *myc3 cop1-21*), y en mutantes de orden superior, convirtiéndose en cuádruples *myc2 myc3 myc4 cop1-21*, quintuples *myc3 myc4 cop1-21 tem1 tem2*, y séxtuples *myc2 myc3 myc4 cop1-21 tem1 tem2*.

De manera consistente con hallazgos previos, las plantas *tem* y *myc cop1* mostraron una floración anticipada bajo fotoperíodos largos (LDs) y cortos (SDs), y los mutantes de orden superior florecieron incluso más temprano que todas las otras combinaciones, especialmente bajo SD.

En nuestras condiciones, observamos una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de floración (valor $p < 0,001$) entre los mutantes quintuples *myc3 myc4 cop1-21 tem1 tem2* y los mutantes séxtuples *myc2 myc3 myc4 cop1-21 tem1 tem2*, sugiriendo que la pérdida de la función de *MYC2* también contribuye a anticipar la transición floral. Precisamente, las plantas *myc cop1 tem* mostraron un fenotipo de floración temprana muy acentuado: comparado con el tipo silvestre (WT), los mutantes séxtuples florecieron diez días antes con cuatro hojas en LDs (Figura 23, A) y siete semanas antes con seis hojas en SDs (Figura 23, B). Así, la pérdida de la función de *TEM* aumenta la floración temprana de *myc cop1*, reduciendo notablemente la respuesta al fotoperiodo en *myc cop1 tem*.

También se analizó la morfología de las hojas de la roseta en la floración en todos los genotipos, ya que los cambios en las estructuras vegetativas están coordinados con el crecimiento reproductivo (Telfer et al., 1997). Se observó que los mutantes séxtuples solo produjeron hojas pequeñas redondeadas y márgenes lisos (Figura 23, C y D). Esta observación, junto con la ausencia de tricomas en la superficie abaxial de las hojas (Figura 23, E), sugiere que las plantas *myc cop1 tem* parecen responder a la inducción floral durante la fase juvenil bajo ambos fotoperíodos.

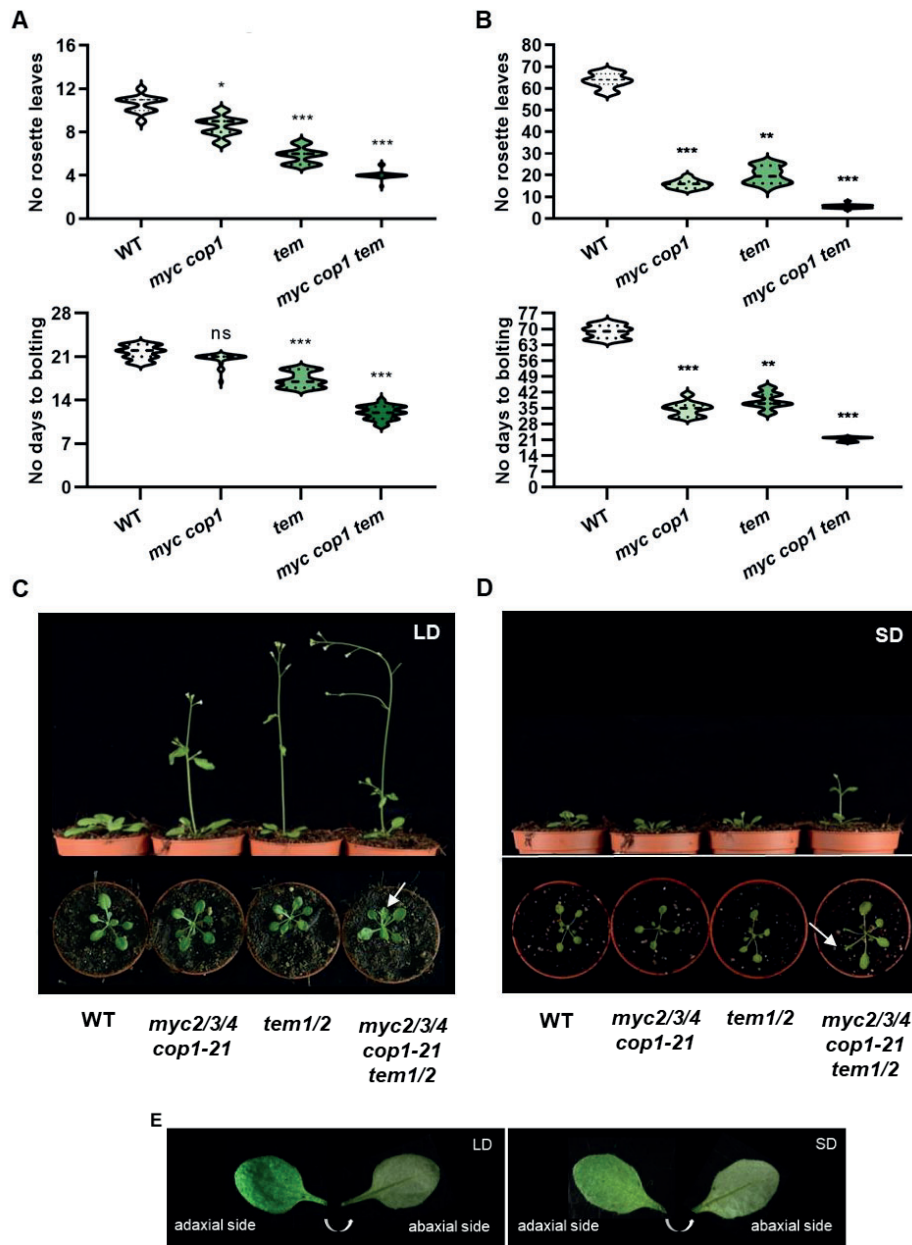


Figura 23. Caracterización fenotípica de mutantes múltiples *myc cop1* y *tem* en la transición floral.

A y B, gráficos de violín mostrando el tiempo de floración, medido como el número de hojas de roseta formadas (arriba) y días hasta la aparición del tallo floral (abajo), de plantas WT (blanco), *myc cop1* (verde claro), *tem* (verde) y *myc cop1 tem* (verde oscuro) (n=19-22) cultivadas en días largos (LDs) (A) y días cortos (SDs) (B) a 22°C. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.033$, ** $P < 0.002$, *** $P < 0.001$), determinadas por ANOVA de Kruskal Wallis de una vía seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Replicas biológicas adicionales en Figuras Complementarias S6. C y D, vistas laterales y superiores de los cuatro genotipos cultivados durante 2 semanas en LDs (C) y 3 semanas en SDs (D). Las flechas indican el desarrollo de la inflorescencia en mutantes séxtuples. E) Imágenes de los lados adaxial y abaxial de las cuartas hojas disecadas de plantas *myc cop1 tem* en el momento de la emisión del tallo floral en días largos (LDs) (izquierda) y días cortos (SDs) (derecha), mostrando la ausencia de tricomas en la superficie inferior de la hoja.

A continuación, se investigó si el crecimiento reproductivo se veía afectado en los mutantes de floración temprana y encontramos una amplia gama de alteraciones fenotípicas, incluyendo la reducción del tamaño de todos los órganos florales en mutantes séxtuples (Figura 24, A). No se observaron defectos macroscópicos en las estructuras reproductivas de *tem*, mientras que una inspección más detallada mostró un desarrollo retardado de los estambres en *myc cop1* (en acuerdo con (Qi et al., 2015) y una dehiscencia retardada en *myc cop1 tem* (Figura 24, A y B).

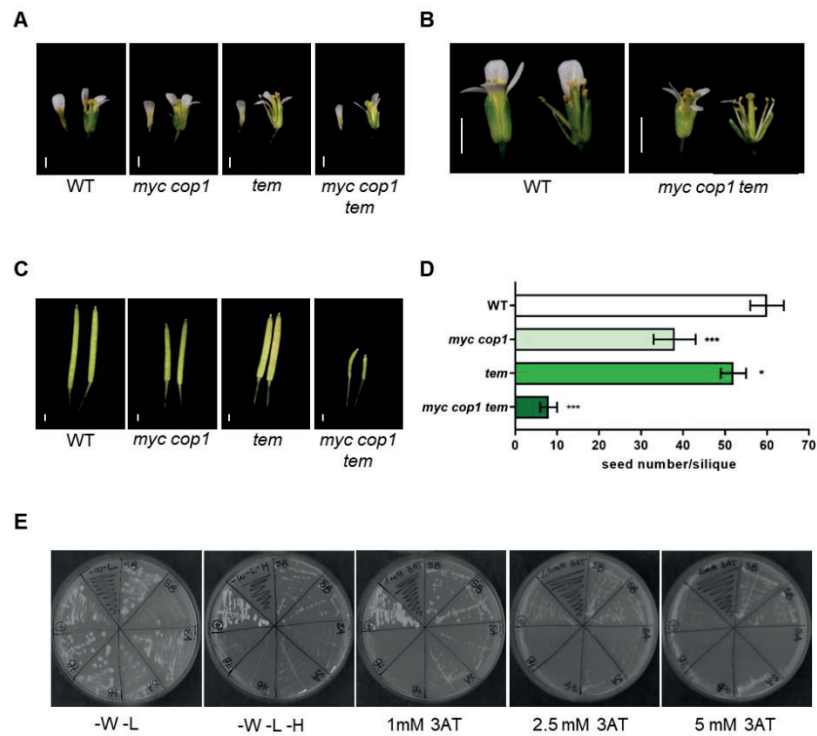


Figura 24. Análisis del desarrollo reproductivo en mutantes múltiples *myc cop1* y *tem*.

A) Imágenes representativas de flores maduras (se retiró un pétalo para inspeccionar los órganos reproductivos) en WT y múltiples mutantes. Barra=1 mm. B) Vistas laterales de flores maduras de WT y *myc cop1 tem*, antes y después de retirar los pétalos. El mutante séxtuple muestra estambres anormales con filamentos más cortos. Barra=1 mm. C) Imágenes representativas de siliques en desarrollo en WT y múltiples mutantes. Barra=1 mm. D) Gráficos de barras que muestran el número de semillas producidas por vaina por los cuatro genotipos; Los datos (5 vainas por genotipo) representan la media con DS de dos réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas determinadas por la prueba ANOVA para comparaciones múltiples (corrección de Dunnet). E) Ensayo Y2H mostrando la interacción entre TEM2-BD y MYB21-AD. Vectores vacíos (AD, BD) se utilizaron como controles negativos. 5B, MYB21-AD+TEM2-BD; 7A, MYB21-AD+BD; 7B, TEM1-BD+AD. Las células de levadura que expresan diferentes combinaciones de vectores AD y BD se sembraron en medio mínimo (- L, W, y H) y medio estricto que contiene una cantidad creciente de 3-AT.

Dado que los defectos en la formación de estambres afectan a la producción de semillas dentro de los frutos en desarrollo (Qi et al., 2015), se analizaron las etapas posteriores del crecimiento reproductivo. A diferencia del desarrollo normal de las inflorescencias de WT, *myc cop1* y *myc cop1 tem* produjeron silicuas más cortas y con un menor contenido de semillas (Figura 24, C y D). Por lo tanto, la caracterización fenotípica de mutantes múltiples durante el desarrollo reproductivo sugiere que la pérdida de la función de *TEM* también agrava los problemas de esterilidad de *myc cop1-21*, resultando en una reducción del conjunto de semillas en mutantes séxtuples (menos del 15% de la producción de semillas de WT).

En la madurez, no se observaron diferencias obvias en el tamaño de las semillas entre WT y *tem*, mientras que *myc cop1* (C. Gao et al., 2016) y *myc cop1 tem* produjeron semillas más grandes (Figura 25, A). Específicamente, los mutantes séxtuples formaron las semillas más grandes, pero en menor cantidad, caracterizadas por una circularidad disminuida relacionada con un aumento significativo en la longitud de la semilla más que en su ancho (Figura 25, B a E). Por lo tanto, los análisis morfológicos de mutantes múltiples en la madurez corroboraron un papel relevante de los MYC en la determinación de las características de las semillas.

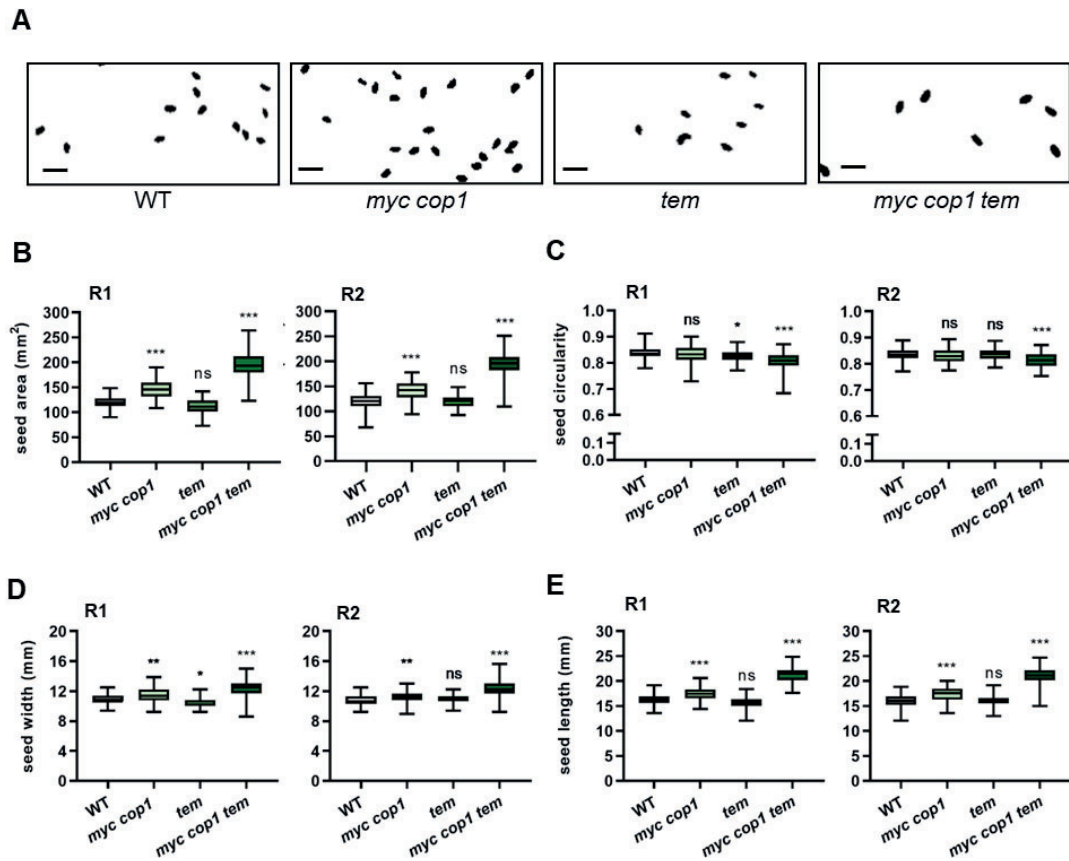


Figura 25. Análisis morfológico de las semillas producidas por mutantes múltiples *myc cop1* y *tem*.

A) Imágenes representativas de semillas (coloreadas falsamente en negro) formadas por plantas WT y mutantes múltiples. Barra=1 mm. B a E, Gráficos de caja mostrando alteraciones en la morfología de las semillas en WT y mutantes de orden superior. Los datos (65-120 semillas por genotipo, dos réplicas biológicas) representan el promedio y las líneas de mínimo a máximo valores de área de semilla (B), circularidad (C), ancho de semilla (D) y longitud de semilla (E). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0.033$, ** $P < 0.002$, *** $P < 0.001$), determinados por la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples (corrección de Dunn).

Los TEM y los MYC regulan la expresión de un conjunto común de genes clave para el tiempo de floración.

El fenotipo extremadamente temprano de floración de los mutantes séxtuples sugirió una relación funcional entre TEM y MYC en el control de la transición floral. Además de su función conocida como represores de *FT* (Castillejo & Pelaz, 2008; H. Wang et al., 2017), se hipotetizó que otros genes del tiempo de floración podrían estar mal regulados. Para probar esta hipótesis, empleamos análisis de expresión a gran escala para examinar cambios en la abundancia de ARNm de reguladores seleccionados que actúan en múltiples vías florales en mutantes de orden superior comparados con WT.

Primero, se monitorizó la expresión de genes clave involucrados en la floración fotoperiódica. Los niveles de transcripción relativos del represor floral *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)* y del activador floral *CONSTANS (CO)* no cambiaron significativamente, pero observamos la sobreexpresión de *GI* en *myc cop1* y *myc cop1 tem* en LDs (Figura 27, A). La expresión de los florigenos *FT* y *TSF* se incrementó en etapas tempranas del desarrollo de las plántulas en todos los mutantes y en plantas *tem* de una semana de edad en condiciones inductivas (Figura 26A), pero se sobreexpresó fuertemente en mutantes séxtuples (*FT*, *fold change* ~15) siete días después de la germinación en condiciones no inductivas (Figura 26, B). Estos resultados sugieren que la actividad reducida de TEM y MYC, junto con la actividad aumentada de CO causada por la mutación *cop1-21*, podría llevar a la pérdida de la respuesta al fotoperiodo debido a la activación de los florigenos independientemente de la duración del día.

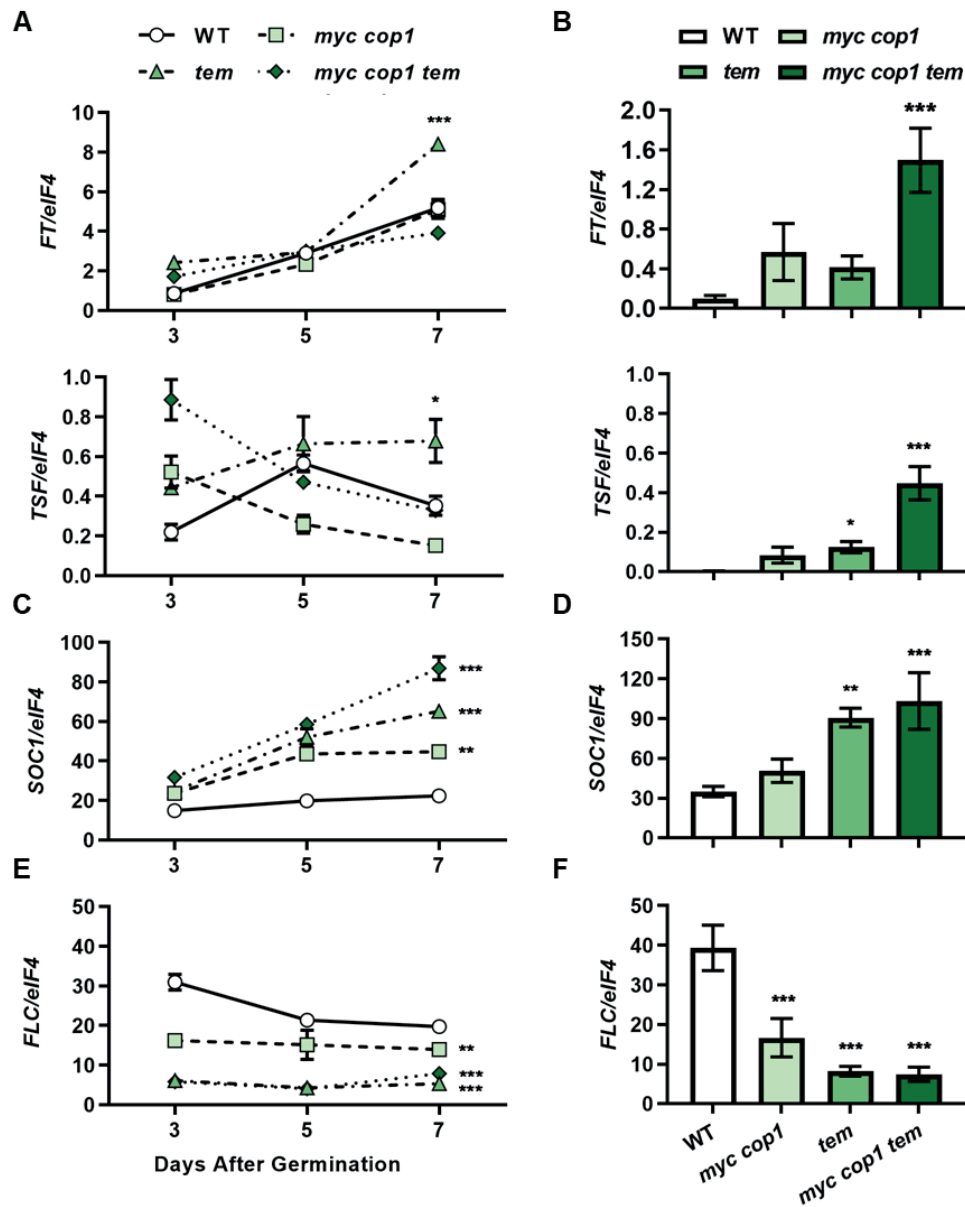


Figura 26. Caracterización molecular de mutantes múltiples *myc cop1* y *tem* en la transición floral.

A a F, Análisis de expresión de genes claves en la determinación del tiempo de floración en mutantes de orden superior en comparación con WT. A) Gráficos de línea que representan los niveles relativos de transcritos de *FT* y *TSF* en plántulas cultivadas por 3, 5 y 7 días en LDs. B) Gráfico de barras que representa los niveles relativos de transcritos de *FT* y *TSF* en plántulas cultivadas por 7 días en SDs. C y D, Upregulación de *SOC1* en mutantes múltiples cultivados en LDs y SDs. E y F, Downregulación de *FLC* en mutantes múltiples cultivados en LDs y SDs. Para el análisis de expresión, las muestras (n=18-20) se recogieron a ZT16 en LDs y ZT12 en SDs. eIF4 fue utilizado para la normalización. Los datos se reportan como el valor medio con DS de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos (* $P < 0.033$, ** $P < 0.002$, *** $P < 0.001$), determinadas por ANOVA de una vía seguida por la prueba de comparación múltiple de Dunnet.

La expresión de represores adicionales de *FT* como *ELF6* (B. Noh et al., 2004), *AGAMOUS-LIKE 15* (*AGL15*) y el relacionado *AGL18* (Adamczyk et al., 2007; Fernandez et al., 2014) no se vio afectada en mutantes de orden superior (Figura Suplementaria S9B). Sin embargo, los mutantes séxtuples mostraron una transcripción aumentada del gen similar a *SOC1*, *AGL42* (Dorca-Fornell et al., 2011) y *AGL9/SEPALLATA3* (*SEP3*) (Pelaz et al., 2000), pero no del relacionado *AGL3/SEP4* (Ditta et al., 2004) (Figura 27C). A pesar de su función principal como factor homeótico floral, *SEP3* también se expresa en las hojas (Figura 27, D), donde actúa en un bucle de retroalimentación positiva con *FT* (Iglesias et al., 2015; Lopez-Vernaza et al., 2012).

Los mutantes múltiples también mostraron una clara sobreexpresión del integrador floral *SOC1* (Figura 26, C y D) y una fuerte desregulación hacia abajo del represor floral *FLC* (Figura 26, E y F). Específicamente, los mutantes séxtuples mostraron los niveles más altos de transcripción de inductores florales y los niveles más bajos de ARNm de *FLC*. Por lo tanto, la caracterización molecular de mutantes múltiples reveló una regulación alterada de genes clave para el tiempo de floración de la familia MADS-box, además de los florígenos.

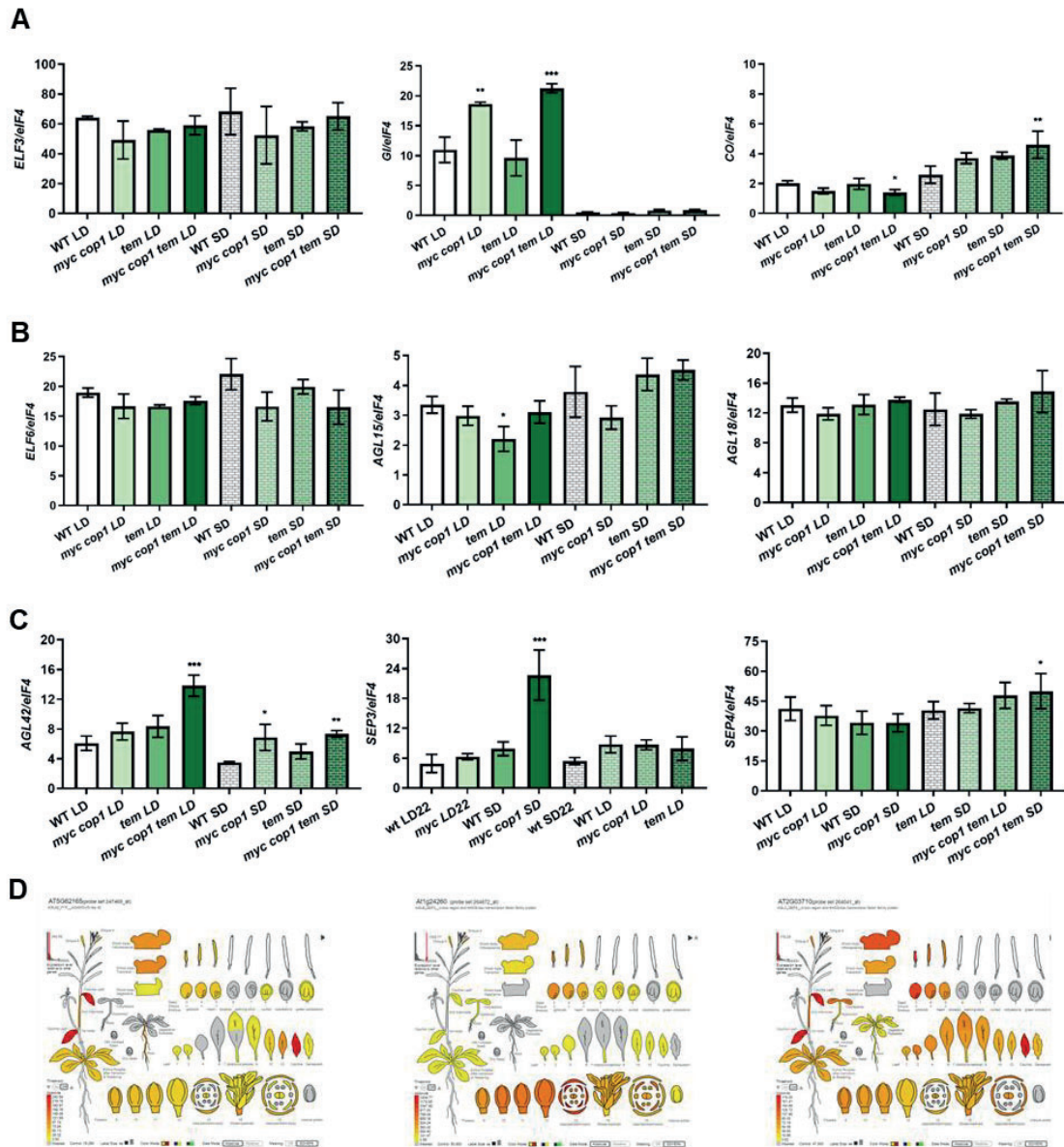


Figura 27. Análisis de la expresión de reguladores del crecimiento reproductivo en mutantes múltiples *myc cop1* y *tem*.

A a C, Gráficos de barras que representan los niveles de expresión relativos de componentes de la vía de respuesta a fotoperiodo (regulador negativo *ELF3*, reguladores positivos *GI* y *CO*), reguladores negativos de *FT* (*ELF6*, *AGL15*, *AGL18*) y genes MADS-box implicados en el desarrollo reproductivo (*AGL42*, *SEP3*, *SEP4*) en WT y mutantes múltiples cultivados por una semana en LD y SD. D) Análisis *in silico* muestra la expresión de los genes *AGL42* (At5g62165), *SEP3* (At1g24260) y *SEP4* (At2g03710) en tejidos vegetativos (hojas, SAM) y reproductivos (Arabidopsis eFP Browser 2.0).

Los TEM regulan la expresión del activador SOC1 y del represor FLC.

A continuación, se analizaron las secuencias de genes seleccionados del tiempo de floración e identificamos secuencias consenso putativas de unión de MYC y/o sitios de unión de RAV en las regiones regulatorias de varios activadores florales que están desregulados en mutantes de orden superior, incluyendo *SOC1*. Este análisis de secuencias sugirió que MYC y TEM podrían unirse directamente a promotores florales importantes, de manera independiente o cooperativa.

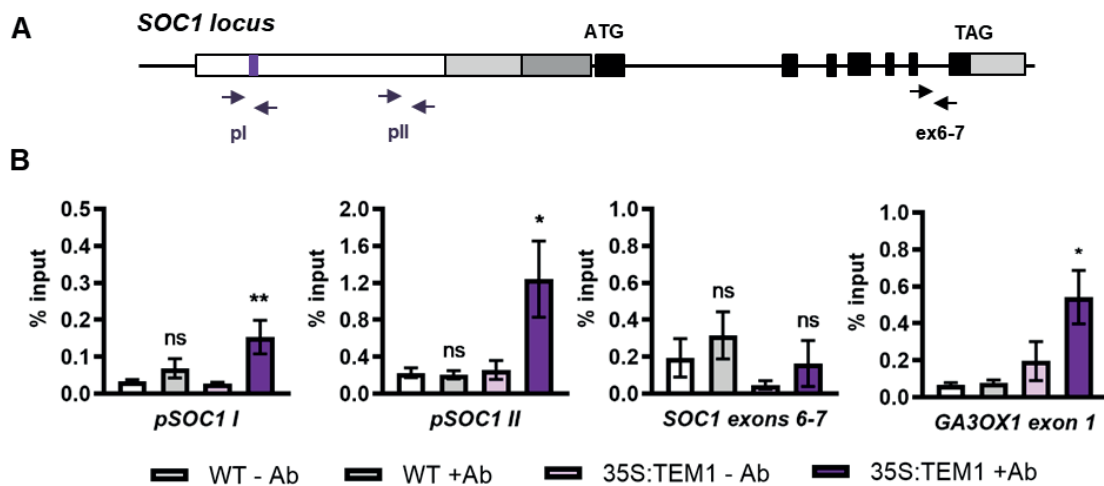


Figura 28. Interacción in vivo entre *TEM1* y regiones regulatorias de *SOC1*.

Interacción *in vivo* entre *TEM1* y regiones regulatorias de *SOC1*. A) Regiones genómicas de *SOC1* analizadas en ensayos ChIP (promotor en blanco; UTRs 5' y 3' en gris; intrón líder en gris oscuro; exones en negro; intrones, línea). B) Análisis ChIP de la unión de *TEM1* a regiones regulatorias de *SOC1*. Se realizaron qPCRs con conjuntos de primers que amplifican regiones promotoras de *SOC1* que contienen sitios de unión similares a los de RAV (pSOC1 I, pSOC1 II), una región que abarca los exones 6 y 7 de *SOC1* como control negativo, y una región que abarca el primer exón de *GA3OX1* como control positivo. Se utilizaron plantas WT (gris) y 35S:TEM1-HA (violeta). Se muestra un representante con barras de error de tres réplicas de qPCR (valor medio, SD)

La pérdida de la función de *TEM* contribuyó principalmente a la sobreexpresión de *SOC1* en mutantes séxtuples en SD (Figura 26, D). En el contexto genético de *tem*, la activación precoz de *SOC1* podría ser mediada por el aumento de la acumulación de GA (como se propone en Osnato et al., 2012), o alternatively, por la disminución de la represión transcripcional. Para determinar si *TEM1* interactúa con secuencias reguladoras de *SOC1* (Figura 28, A), empleamos plantas sobre-expresando *TEM1* en ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP) y encontramos un enriquecimiento significativo en la región promotora que contiene sitios de unión similares a RAV pero no

en exones (Figura 28, B.), sugiriendo que TEM1 también puede regular directamente a *SOC1* a través de la unión a sus regiones regulatorias.

Por otro lado, la fuerte inhibición de *FLC* en todas las combinaciones de mutantes en LD y SD (Figura 26, E y F) indicó que los MYC y TEM regulan positivamente a *FLC*, probablemente modulando la actividad de sus reguladores. En ese caso, la sobreexpresión de represores de *FLC* en contextos de mutantes podría llevar al silenciamiento de *FLC*, dependiente e independientemente de FT.

Entre los reguladores conocidos de *FLC*, se seleccionaron miembros de la ruta autónoma que determinan el cambio de la transcripción activa a la represión, especialmente aquellos que alteran el estado de la cromatina del locus de *FLC* (Figura 29, A). *FLOWERING LOCUS D* (*FLD*, He et al., 2003) está claramente sobreexpresado (*fold change* ~2) en todas las combinaciones de mutantes, mientras que los ARNm de *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 4* (*MSI4/FVE*, Ausín et al., 2004)) y *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6* (*REF6*, (Lu et al., 2014; B. Noh et al., 2004) se acumularon a los niveles más altos solo en mutantes séxtuples en SDs (Figura 29, B). Sin embargo, la transcripción del gen homeobox *LUMINIDEPENDENS* (*LD*, I. Lee et al., 1994) y de otros genes de la ruta autónoma que codifican proteínas de unión a ARN mostraron una expresión inalterada en múltiples mutantes (Figura 29, C), con la excepción de una ligera sobreexpresión de *FLOWERING LOCUS K* (*FLK*) (M.-H. Lim et al., 2004). Así, los análisis de expresión de miembros de la ruta autónoma en múltiples mutantes sugirieron que la sobreexpresión de activadores florales involucrados en la remodelación de la cromatina de *FLC* (la demetilasa de Histona H3K4 FLD, la deacetilasa de histona FVE y la demetilasa de Histona H3K27 REF6) podría explicar la inhibición de *FLC*.

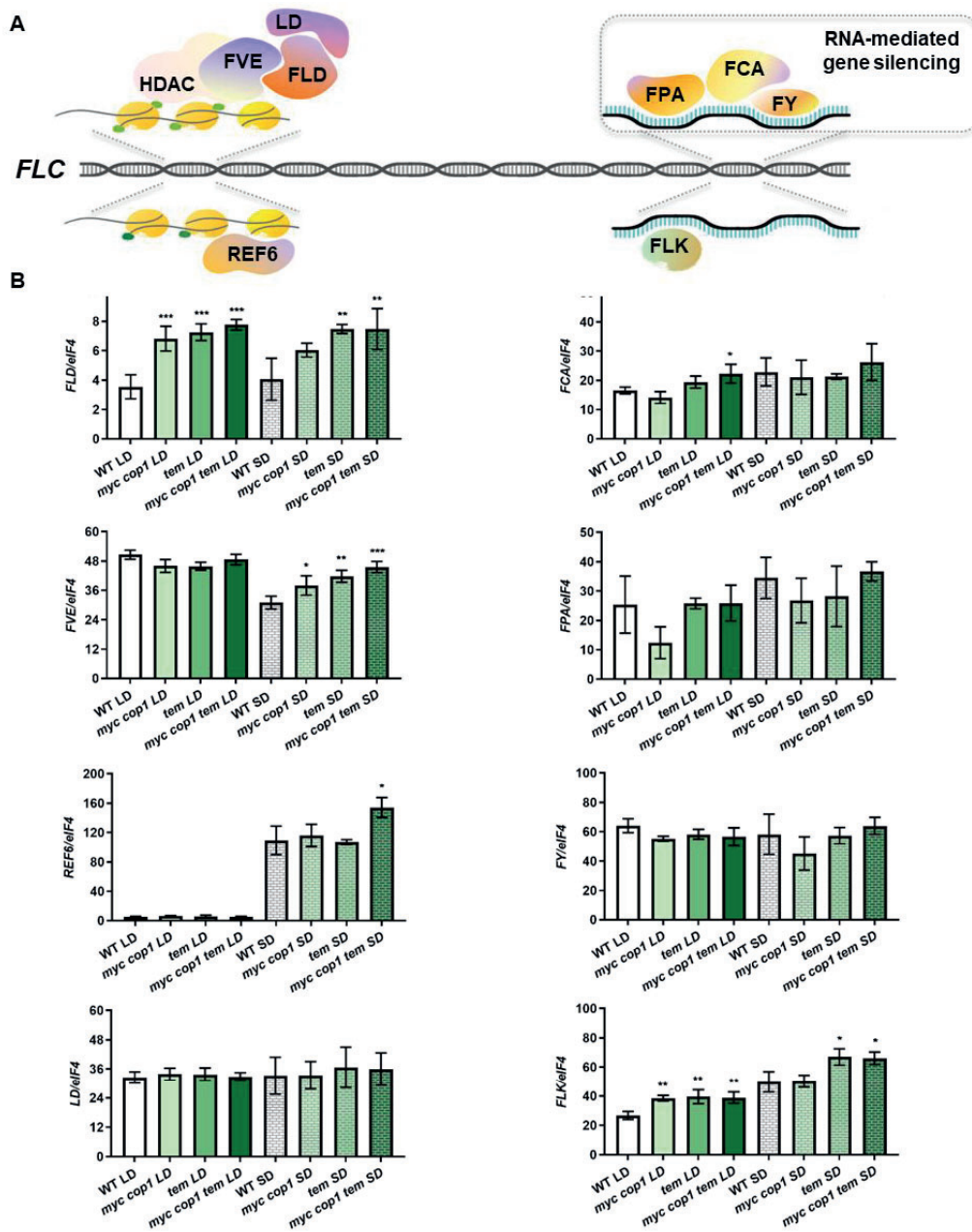


Figura 29. Efecto de la pérdida de función de MYC y TEM en la expresión de miembros de la ruta autónoma.

A) Representaciones esquemáticas de componentes de la vía autónoma que actúan por encima de/regulando a *FLC*. B y C, Análisis de expresión de activadores florales de la vía autónoma en WT y mutantes múltiples cultivados por una semana en LD y SD. B) Gráficos de barras que representan los niveles de expresión relativos de los modificadores de histonas *FLD*, *FVE*, *REF6* y *LD*. C) Gráficos de barras que representan los niveles de expresión relativos de factores de procesamiento de ARN - *FLOWERING CONTROL LOCUS A* (*FCA*), de control del tiempo de floración *FPA*, *FY*, y *FLK*. Las barras de error representan la DS de 3 réplicas biológicas.

A continuación, se hizo uso de ChIP-qPCR para examinar la deposición de diferentes marcas de histonas en el locus de *FLC* (Figura 30, A) en plantas WT y mutantes cultivadas en SDs. Usando anticuerpos específicos contra Histona acetilada, las plantas WT mostraron el mayor enriquecimiento en regiones reguladoras importantes del gen *FLC* (Figura 30, B), sugiriendo una correlación entre MYC/TEM y las modificaciones de la cromatina relacionadas con la transcripción activa. Usando anticuerpos contra Histona H3 tri-metilada, los mutantes séxtuples mostraron un enriquecimiento significativo en una región cercana al codón de INICIO del gen *FLC* (Figura 30, C), sugiriendo una correlación entre los represores florales mutados y el aumento de las modificaciones de la cromatina relacionadas con el silenciamiento del gen *FLC*. A pesar de la variabilidad biológica, los ensayos ChIP revelaron que las modificaciones epigenéticas en el locus de *FLC*, incluyendo la eliminación de grupos acetilo de las colas de las histonas centrales, podrían explicar la reducción de la transcripción de *FLC* en múltiples mutantes.

Siguiendo esta lógica, los MYC y TEM funcionales podrían regular positivamente al represor floral *FLC* en WT reprimiendo factores involucrados en su silenciamiento. Por el contrario, los defectos en *MYC* y *TEM* podrían causar la activación de los florigenos y activadores florales de la ruta autónoma, dando lugar a una floración extremadamente temprana de los mutantes séxtuples.

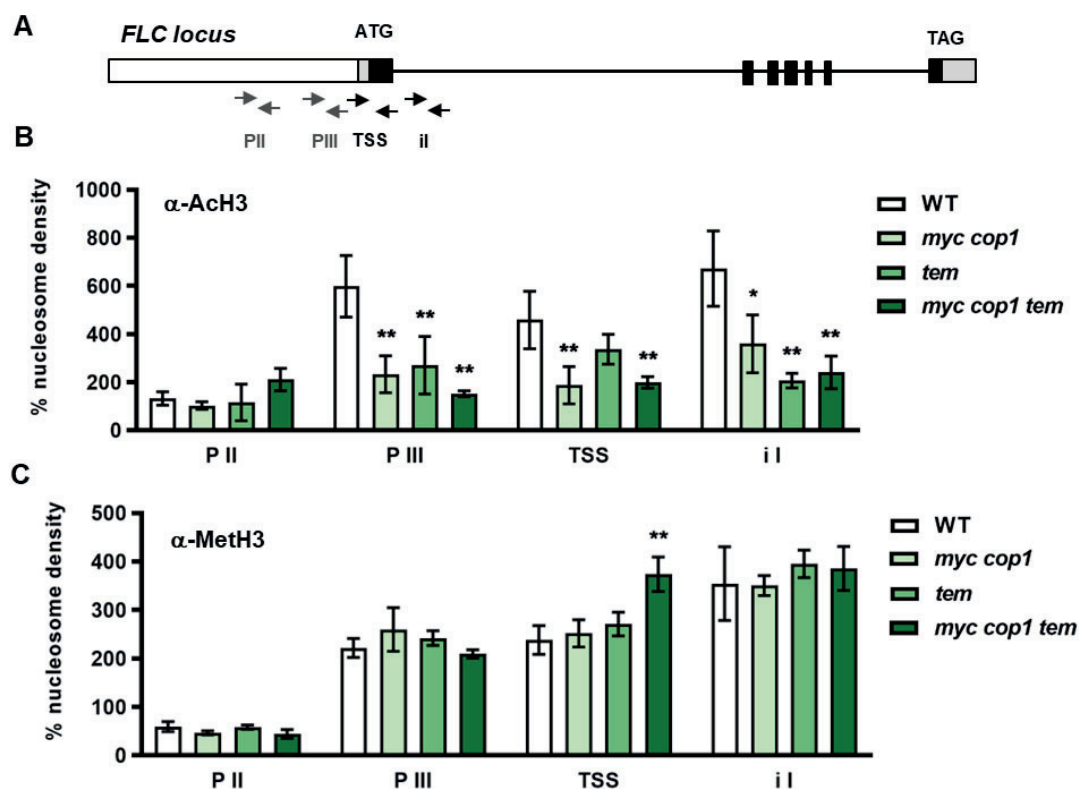


Figura 30. Análisis de modificaciones de histonas de FLC en mutantes *myc cop1* y *tem*

A) Regiones genómicas de *FLC* analizadas en ensayos ChIP (promotor en blanco; UTRs 5' y 3' en gris; exones en negro; intrones, línea). Las flechas indican los primers utilizados en qPCR. B y C, Enriquecimiento de marcas de histonas relacionadas con la transcripción activa y el silenciamiento, respectivamente, en plantas cultivadas en SDs. Resultados de qPCR mostrando disminución de la acetilación de la histona H3 (B) y aumento de la tri-metilación de la histona H3 (C) en regiones específicas de *FLC* en mutantes múltiples. Los valores son la media de tres réplicas independientes con DS. Los asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos (* $P < 0.033$, ** $P < 0.002$, *** $P < 0.001$), determinadas por ANOVA de una vía seguida por la prueba de comparación múltiple de Dunnet. Cromatina IP con anticuerpos contra la Histona H3 fue utilizada para la normalización.

Los componentes de las rutas del fotoperiodo y la ruta autónoma también modulan la floración en respuesta a un aumento de la temperatura ambiente (Balasubramanian et al., 2006; Blázquez et al., 2003; Iglesias et al., 2015) o una disminución de la disponibilidad de agua (Hwang et al., 2019; Riboni et al., 2013). Para investigar la posible implicación de los represores florales en estudio, TEM y MYC, en estos procesos, se examinaron las alteraciones del desarrollo de WT y mutantes múltiples cultivados en diferentes condiciones subóptimas.

Primero, se monitorizaron los cambios en el tiempo de floración de plantas cultivadas a temperaturas ambientales elevadas (27°C) en comparación con la temperatura óptima de crecimiento (22°C). En LDs, los cuatro genotipos florecieron con un número similar de hojas de roseta a 27°C y 22°C (Figura 31, A); sin embargo, se observó una disminución significativa en el número de días hasta la aparición de la inflorescencia en plantas WT, *myc cop1* y *tem* (valor $p < 0,001$, ~ 4-5 días) a 27°C pero no en mutantes *myc cop1 tem* (Figura 31, B). De igual manera, todos los genotipos, excepto el mutante séxtuple, florecieron mucho antes a 27°C que a 22°C en SDs (Figura 31, C y D). Notablemente, las plantas *myc cop1* y *tem* florecieron con un número similar de hojas a 27°C en SDs y a 22°C en LDs, corroborando el hallazgo de que un aumento de 5°C en la temperatura ambiente compensa la disminución de 8 horas en la duración del día (Balasubramanian et al., 2006). Sin embargo, la temperatura más cálida no afectó el fenotipo de floración temprana de *myc cop1 tem*, sugiriendo que los alelos *tem* potencian el fenotipo de floración temprana del mutante cuádruple *myc cop1* y contribuyen a la pérdida de la inducción fotoperiódica y térmica de la floración observada en mutantes séxtuples.

En SDs, la floración acelerada observada en plantas *myc cop1* y *tem* cultivadas a 27°C (en comparación con 22°C) podría ser causada por una expresión incrementada de *FT/TSF* y *REF6* (Figura 31, E), que recientemente ha demostrado jugar un papel clave en la termomorfogénesis (He et al., 2002). La sobreexpresión de promotores florales también se produce por una drástica inhibición de *FLC* en todos los mutantes (Figura 31, F). A temperatura más cálida, los mutantes *myc cop1* también mostraron una transcripción ligeramente incrementada de *SOC1*, *FLD* y *SEP3* (Figura 31, G). Curiosamente, la activación de *SEP3* en tejidos vasculares a 28°C parece acelerar la floración al inducir *FT* (Iglesias et al., 2015). En cambio, la expresión de otros genes de la ruta autónoma, como *FLK* y los dos de la respuesta termosensorial (*FVE* y *FCA*, (Blázquez et al., 2003), no cambió en mutantes a 27°C en SDs (Figura 31, H).

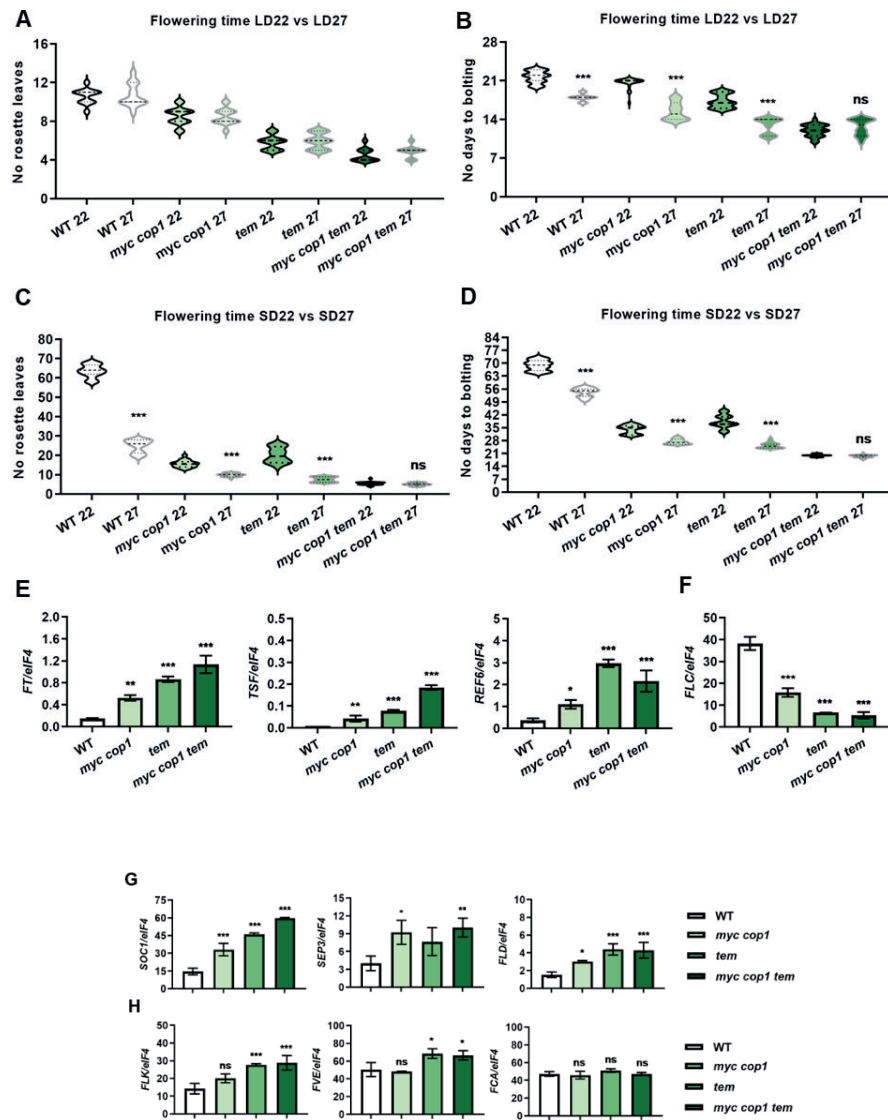


Figura 31. Efecto la temperatura cálida sobre el tiempo de floración y la expresión de reguladores de la inducción floral de mutantes *myc cop1* y *tem*.

A a D, gráficos de violín que muestran el fenotipo del tiempo de floración (arriba, número de hojas de roseta formadas; abajo, días hasta la aparición del tallo floral) de los cuatro genotipos cultivados a 22°C versus 27°C en LDs (A, B) y SDs (C, D). Réplicas biológicas adicionales aparecen en la Figura Complementaria S13. Los datos (20-24 plantas de cada genotipo) se analizaron con una prueba t de dos colas no emparejada comparando dos grupos, 22°C vs 27°C. Los asteriscos indican significancia estadística con * $P < 0.033$, ** $P < 0.002$, *** $P < 0.001$. E, F; G H) gráficos de barras que representan los niveles de transcripción relativos de *FT*/*TSF*, *REF6*, *FLC*, *SOC1* y *FLK* en diferentes fondos genéticos cultivados durante 1 semana en SDs a 27°C. Para el análisis de expresión, las muestras (n=18-20) se recolectaron a ZT12, se utilizó eIF4 para la normalización. Los datos se reportan como el valor medio con DS de tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas entre genotipos (* $P < 0.033$, ** $P < 0.002$, *** $P < 0.001$), determinadas por ANOVA de una vía seguida por la prueba de comparación múltiple de Dunnett.

Posteriormente, analizamos las alteraciones fenotípicas de las plantas crecidas con escasez de agua. Los cuatro genotipos fueron sometidos a tres regímenes de agua irrigando cada volumen de suelo con 1 volumen (100%, control), 1/2 volumen (50%, limitación leve de agua) y 1/4 volumen (25%, limitación severa de agua) de agua. En LDs, no se pudo evaluar el impacto de la privación de agua en la transición floral ya que los mutantes de orden superior crecieron y florecieron lo suficientemente rápido como para eludir la sequía. En SDs, la limitación continua de agua afectó severamente el crecimiento general de los cuatro genotipos, pero el WT mostró el impacto más drástico en la fase vegetativa (Figura 32, A) y la tasa de mortalidad más alta antes de la madurez (Figura 32, B). En un fotoperiodo no inductivo, los mutantes múltiples florecieron con un número similar de hojas de roseta y días hasta la aparición del tallo independientemente del régimen de agua (Figura 32, B), sugiriendo que TEM/MYC podrían mediar la respuesta de la planta a la escasez de agua en la transición floral.

Como a menudo la limitación de agua es una consecuencia u ocurre junto a condiciones de crecimiento más cálidas, evaluamos las alteraciones en el tiempo de floración de los cuatro genotipos en respuesta a una combinación de los dos factores de estrés ambiental. En SDs, la mayoría de las plantas WT sometidas a privación de agua a 27°C murieron durante la fase vegetativa, mientras que los mutantes de floración temprana en las mismas condiciones de estrés alcanzaron la fase reproductiva y se secaron en la madurez (Figura 32, C). Sorprendentemente, la limitación severa de agua a 27°C retrasó los días hasta la aparición del tallo floral en *myc cop1* y *tem*, pero no en *myc cop1 tem*. Por lo tanto, los análisis fenotípicos sugirieron que la actividad reducida de los represores florales TEM y MYC podría conferir una tolerancia aumentada a esos estreses abióticos que imitan condiciones ambientales adversas relacionadas con el cambio climático (por ejemplo, clima más cálido y seco al final del invierno), presumiblemente acortando el ciclo de vida y disminuyendo la superficie expuesta al estrés.

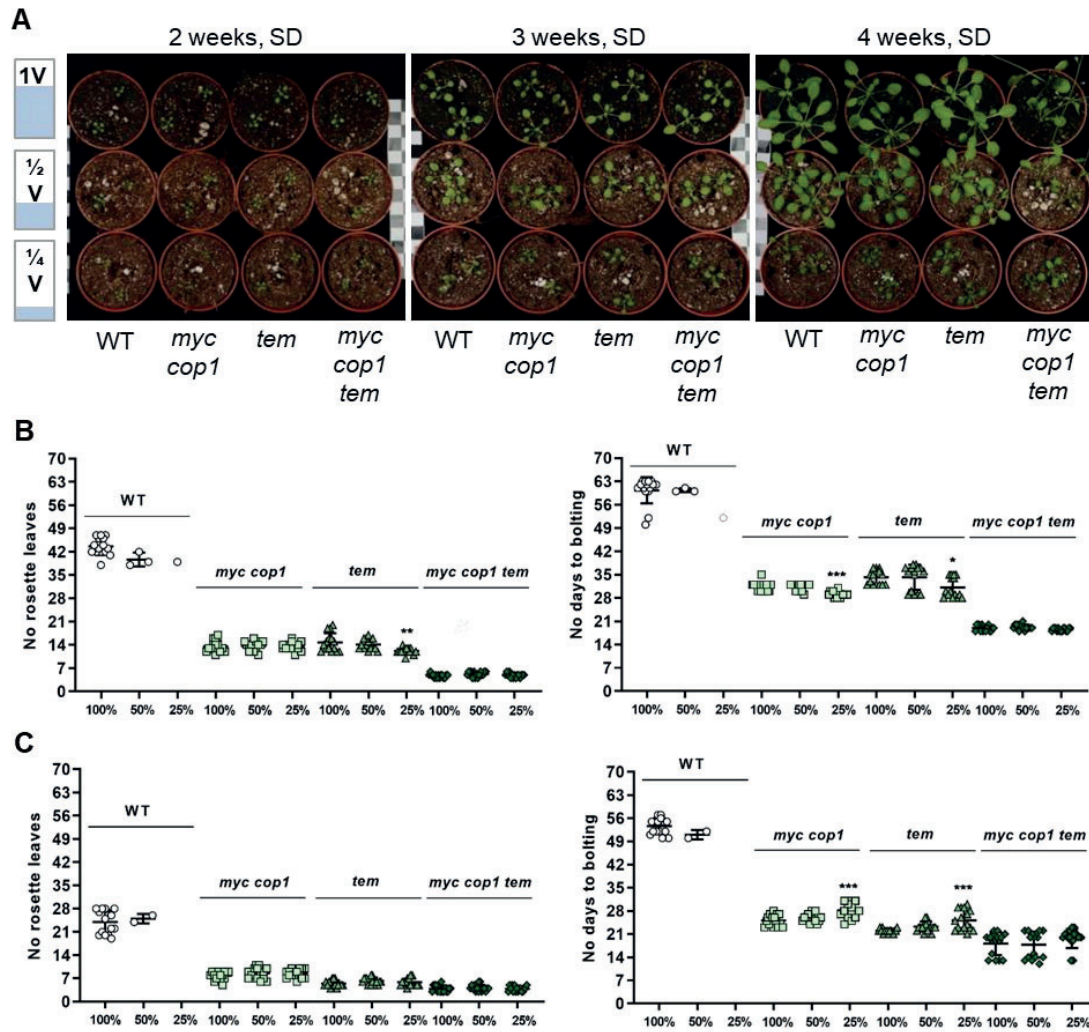


Figura 32. Efecto de la limitación de agua en el crecimiento y la floración de mutantes *myc cop1* y *tem*.

A) Imágenes representativas de plantas WT, *myc cop1*, *tem* y *myc cop1 tem* cultivadas durante dos, tres y cuatro semanas en SDs con disponibilidad decreciente de agua. Plantas control (100, 1 volumen H₂O/1 volumen suelo) en la parte superior, plantas sometidas a limitación leve de agua (50, 1/2 volumen H₂O/1 volumen suelo) en el medio, plantas sometidas a limitación severa de agua (25, 1/4 volumen H₂O/1 volumen suelo) en la parte inferior. B y C, gráficos de dispersión que muestran el fenotipo del tiempo de floración, medido como el número de hojas de roseta y el número de días hasta la aparición del tallo floral, de plantas individuales WT y mutantes (15-18 de cada genotipo) sometidas a disponibilidad decreciente de agua (100%, 50%, 25% SWC) bajo SDs a 22 °C (B) y 27°C (C), respectivamente. La mayoría de las plantas WT murieron antes de la floración en condiciones de escasez de agua.

Además de la limitación de agua, también se evaluaron las plantas adultas por su tolerancia a la desecación en SDs mediante la retención de agua durante una semana. Sorprendentemente, los mutantes *myc cop1* y *tem* mostraron las tasas de supervivencia más baja y más alta, respectivamente, tres días después del re-riego, indicando susceptibilidad distinta a la privación de agua (Figura 33, A y B). Para evaluar el rendimiento diferencial de los mutantes de floración temprana a la escasez de agua en SDs, se analizó el comportamiento de los cuatro genotipos en respuesta a la disminución del contenido de agua del suelo (SWC) y encontramos una tasa de transpiración más alta en *myc cop1* y *myc cop1 tem* en comparación con WT y *tem* (Figura 33, C). Por lo tanto, los alelos mutantes de *myc* y/o *cop1* podrían causar hipersensibilidad a la deshidratación, probablemente debido a una mayor pérdida de agua.

Como la transpiración es regulada por los estomas, examinamos las superficies abaxiales de las hojas diseccionadas de plantas adultas cultivadas en SDs en buenas condiciones de riego y en limitación severa de agua. Las observaciones por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron que los mutantes múltiples produjeron más estomas que las plantas WT, tanto en condiciones controladas como de estrés por sequía (Figura 35, A). También confirmamos una densidad de estomas más alta en mutantes múltiples mediante experimentos de pelado de la epidermis abaxial de la hoja de los cuatro genotipos cultivados en condiciones controladas (Figura 34, A). En estos contextos genéticos, no detectamos agrupación de estomas (típico de mutantes con sobre-proliferación de estomas) sino más bien varios grupos de dos estomas espaciados por una célula pavimentosa interviniente (Figura 35, B). Sin embargo, los estomas de las plantas mutantes *tem* parecían estar aumentados en número pero disminuidos en tamaño, sugiriendo que las células guardia podrían tener una actividad reducida para el intercambio de gases. Por lo tanto, empleamos imágenes térmicas para medir cambios en la temperatura de las superficies de la roseta de plantas WT versus mutantes y observamos una temperatura más alta en mutantes *tem* - correspondiente a transpiración reducida - pero una temperatura más baja en *myc cop1* y *myc cop1 tem* - correspondiente a transpiración aumentada (Figura 34, B).

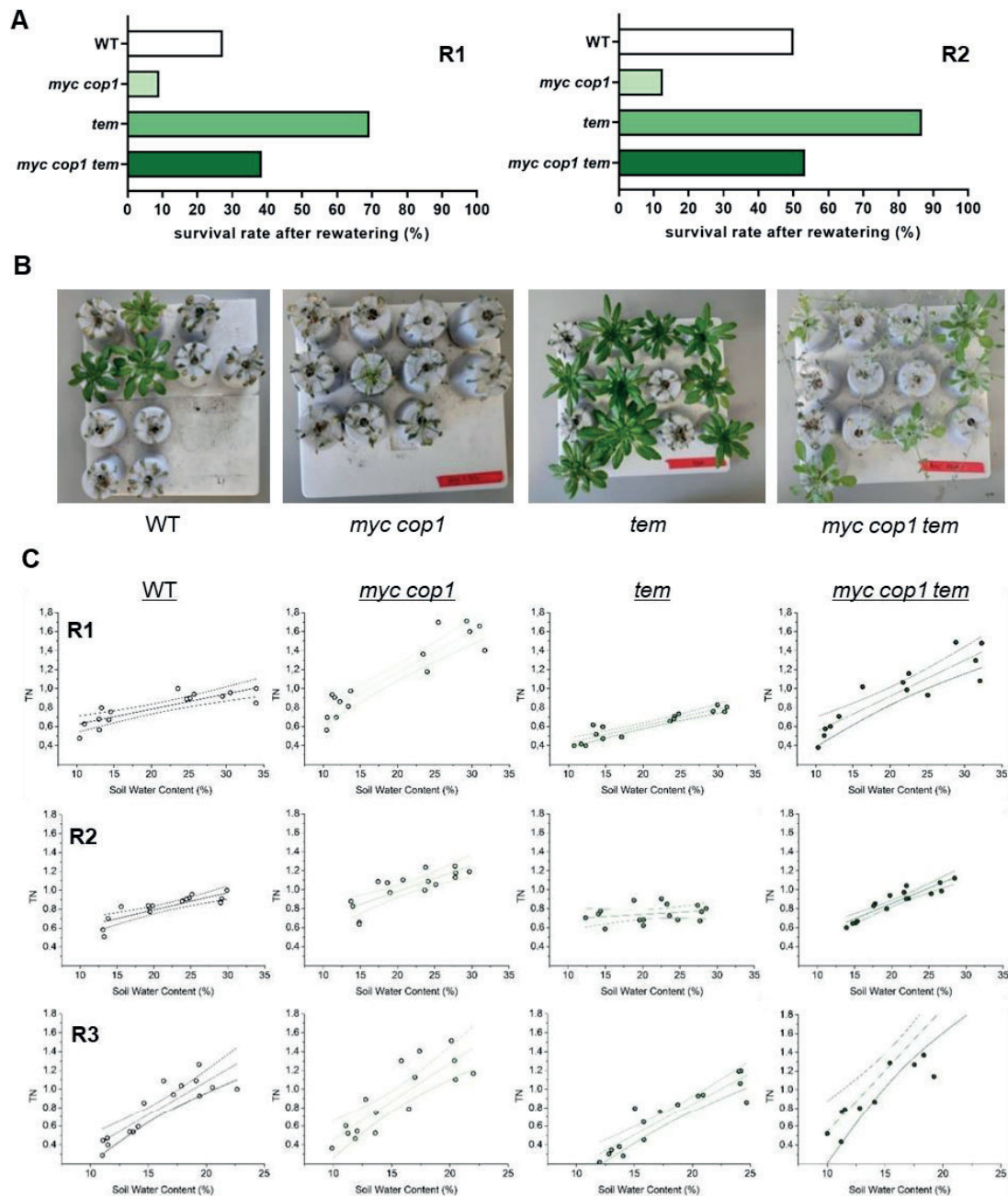


Figura 33. Análisis fisiológicos de mutantes *myc cop1* y *tem* en respuesta a la privación de agua.

A) Gráficos de barras que muestran la tasa de supervivencia de plantas WT y mutantes múltiples (16 plantas de cada genotipo) sometidos a 7 días de retención de agua, 3 días después de la rehidratación. Se reportan dos réplicas biológicas con una tendencia similar. B) Imágenes que muestran la mayor mortalidad de *myc cop1* y la mayor supervivencia de *tem* en respuesta a la deshidratación. C) Análisis de la tasa de transpiración en condiciones controladas y de estrés hídrico. Gráficos que muestran el SWC (% del peso de la maceta/peso de la maceta a plena capacidad de agua) versus la transpiración de la planta entera ($\text{ml}/\text{cm}^2\text{día}^{-1}$) en WT y mutantes múltiples cultivados en SDs con disponibilidad de agua decreciente (de alto a bajo SWC). Se presentan tres réplicas biológicas.

En conjunto, los análisis morfológicos y fisiológicos sugirieron que los represores florales en estudio podrían regular el intercambio de gases modulando el patrón o funcionamiento de los estomas. MYC y TEM podrían controlar la densidad de los estomas a través de la fitohormona Ácido Jasmonico (JA), un regulador negativo del desarrollo de estomas (Han et al., 2018). De hecho, el contenido reducido de JA en plantas *myc* y *tem* (según Han et al., 2018; Osnato et al., 2021), asociado con la desregulación hacia abajo de genes biosintéticos críticos de JA (Figura 34, C), podría ser la causa de la formación incrementada de estomas en hojas de mutantes múltiples.

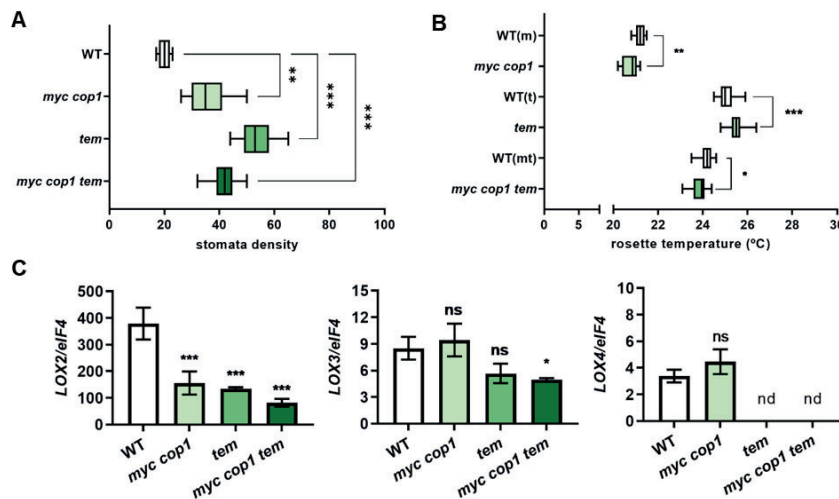


Figura 34. Caracterización de los fenotipos de los estomas de los mutantes *myc cop1* y *tem* en condiciones controladas

A) Gráficos que muestran la densidad de estomas (número de estomas en un área de 0.5 mm²) de mutantes múltiples en comparación con WT. Los datos (10 sectores de hojas por genotipo, dos réplicas biológicas) representan el promedio y los extremos desde los valores mínimos hasta los máximos. Los asteriscos indican significancia estadística (* P < 0.033, ** P < 0.002, *** P < 0.001), determinada por la prueba de Kruskal-Wallis. B) Gráficos que muestran alteraciones en la temperatura de las superficies de la roseta de mutantes múltiples en comparación con WT. Para cada genotipo, las medidas son el promedio de tres filas diferentes de cuatro plantas (3 sectores de hoja cada una), y los extremos representan los valores mínimos y máximos. Los asteriscos indican significancia estadística (* P < 0.033, ** P < 0.002, *** P < 0.001), determinada por la prueba t de dos colas no emparejada. C) Gráficos de barras que representan los niveles de expresión relativos de genes que codifican enzimas clave involucradas en el primer paso de la biosíntesis de JA - LIPOXIGENASA 2 (LOX2), LOX3 y LOX4 - en diferentes fondos genéticos cultivados durante 1 semana en SD. Nd, no detectado.

Las proteínas MYC también reprimen genes clave bHLH que codifican reguladores positivos de la diferenciación de estomas (Han et al., 2018), mientras que el papel de los factores TEM en la formación y actividad de tipos de células específicas de la hoja todavía está por investigarse completamente. Es interesante que los genes *TEM* se expresan en el mesófilo, donde controlan la formación de tricomas en el lado adaxial de la hoja modulando la acumulación y distribución de GA (Matías-Hernández et al., 2016), pero también de los estomas en diferentes etapas del desarrollo, desde la especificación del linaje celular de los estomas hasta la diferenciación de las células guardia. Además, análisis transcriptómicos previos (Osnato et al., 2021) revelaron la desregulación de ocho genes involucrados en el patrón y funcionamiento de los estomas en plantas que sobreexpresan *TEM1* comparados con las WT. Por lo tanto, monitoreamos los cambios en los niveles de expresión de los genes seleccionados de estomas y encontramos que las plantas mutantes *tem* mostraron una disminución en los niveles de ARNm de *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1* (*SDD1*; (Berger & Altmann, 2000; Von Groll et al., 2002), *ERECTA* (*ER*) y *ERECTA LIKE 2* (*ERL2*, (Shpak et al., 2005), que codifican reguladores negativos de la formación de estomas, pero una expresión inalterada de *MYB61* (Liang et al., 2005) y *IQM1* (Y.-P. Zhou et al., 2012), que codifican proteínas involucradas en la apertura/cierre de estomas (Figura 34, A).

La inhibición de genes que regulan negativamente los primeros pasos del desarrollo estomático podría explicar el mayor número de células guardias inmaduras encontradas en las hojas *tem* (Figura 34, B), reminiscente de los mutantes conocidos de densidad de estomas (Lawson et al., 2014). Por lo tanto, los análisis moleculares y morfológicos proporcionaron más evidencia de una función nueva de los TEM en el establecimiento del patrón de formación de estomas.

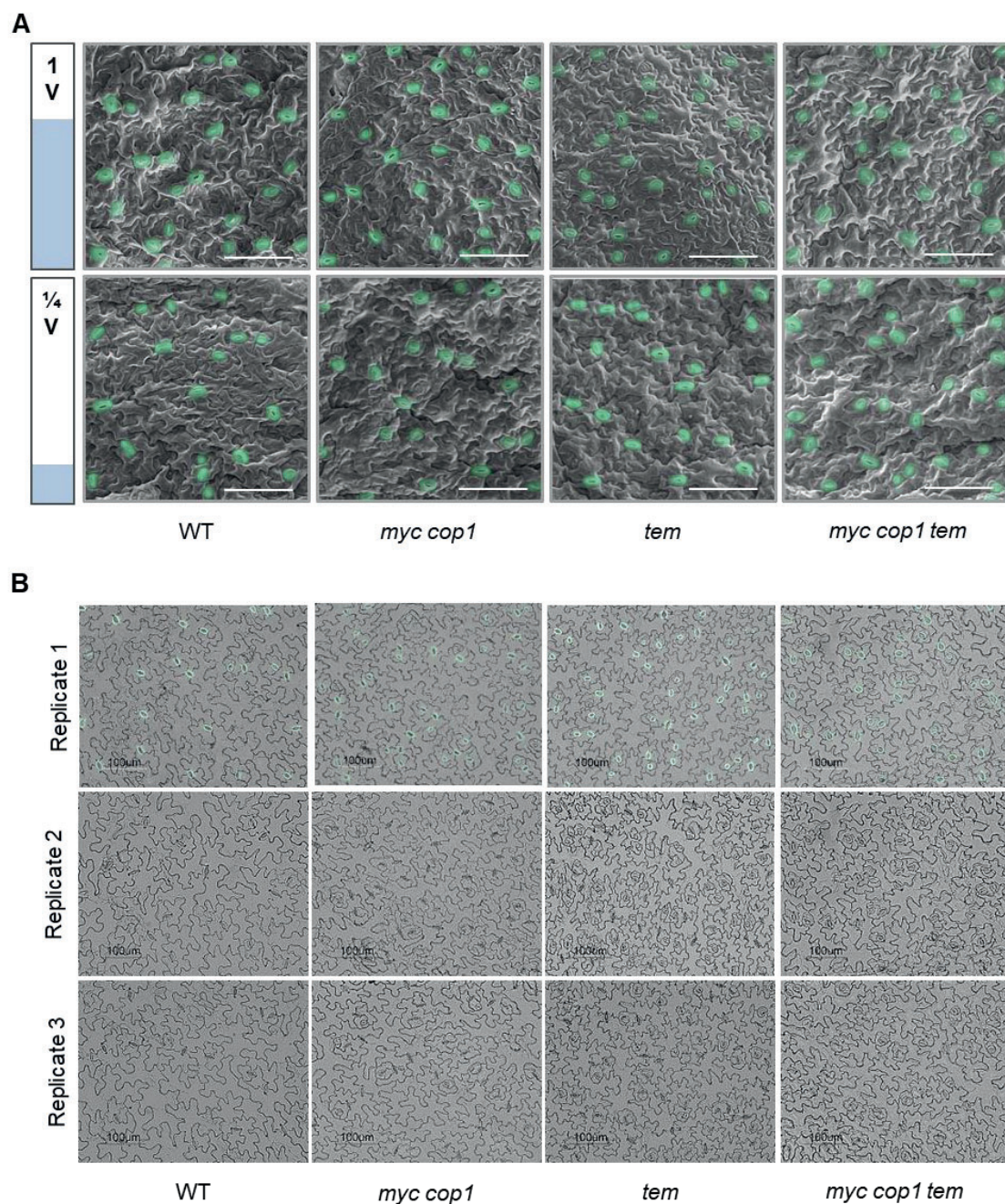


Figura 35. Análisis morfológicos de hojas de mutantes *myc cop1* y *tem* en condiciones de buena hidratación y de limitación severa de agua.

A) Imágenes representativas obtenidas por SEM que muestran células epidérmicas de las cuartas hojas disecadas de los cuatro genotipos cultivados durante 3 semanas en SDs en condiciones controladas (arriba) versus privación de agua (abajo). Estomas maduros, coloreados falsamente en verde. Barra=10 mm. B) Imágenes de Microscopía de Luz que muestran el lado abaxial de hojas verdaderas completamente expandidas (obtenidas por pelado epidérmico) disecadas de plantas cultivadas durante 3 semanas en SDs en condiciones de buena hidratación. En diferentes experimentos, los mutantes múltiples mostraron un aumento en la producción de estomas. Barra= 100 μm.

Módulo GI-TEM-SVP en estrés abiótico

*Los mutantes *gi* mueren antes de realizar la transición floral en condiciones de sequía*

GI desempeña un papel crucial en la inducción floral en *Arabidopsis* a través de la regulación del tiempo y amplitud de la expresión de CO. GI se acumula por la tarde y estabiliza FKF1, facilitando la degradación de ciertos factores de transcripción como SVP y TEM (Sawa & Kay, 2011) y promoviendo la activación de FT (Kinoshita & Richter, 2020).

por lo que una vez establecida la insensibilidad de los de los mutantes *tem* al efecto de la sequía sobre la inducción floral, se decidió analizar la relación que pudiera tener con el gen *GI*.

En primer lugar, se puso a prueba el efecto de la sequía sobre los mutantes *gi* que nuestras condiciones experimentales pudieran tener. En condiciones de reducción de riego, y tal como se esperaba por trabajos previos (Riboni et al., 2013, 2016), las plantas WT aceleran su floración, pero los mutantes *gi*, de floración tardía, carecen de esta capacidad de adelanto y mueren antes de poder florecer (Figura 36) tanto en las condiciones de sequía media (50%) como en las condiciones de sequía severa (25%).

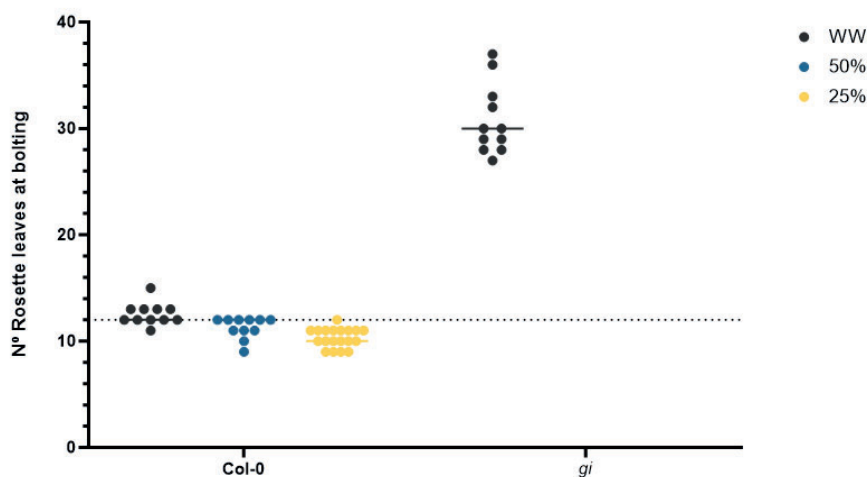
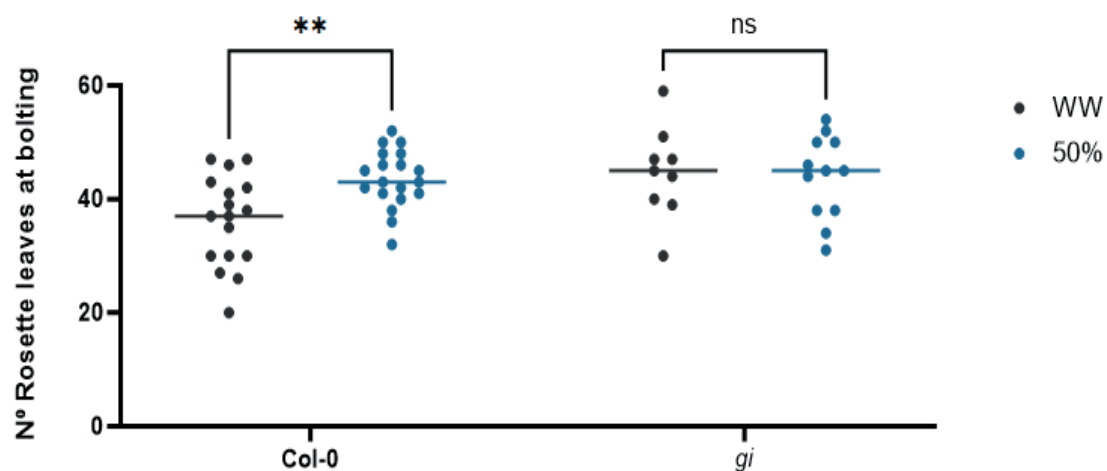


Figura 36. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día largo

En condiciones de SD no se produce la respuesta de escape a sequía ya que depende de condiciones inductivas de fotoperiodo. En SD las plantas WT florecen mucho más tarde que en LD (Figura 36Figura 37), sin embargo, las plantas mutantes *gi* florecen prácticamente al mismo tiempo en LD y SD. En condiciones de reducción de agua a la mitad, se retrasa ligeramente el tiempo de floración de las plantas WT y no varía el de las mutantes *gi*. No se pudo medir el tiempo de floración en condiciones de sequía severa ya las plantas mueren antes de llegar a florecer al no activarse el mecanismo de escape a la



sequía.

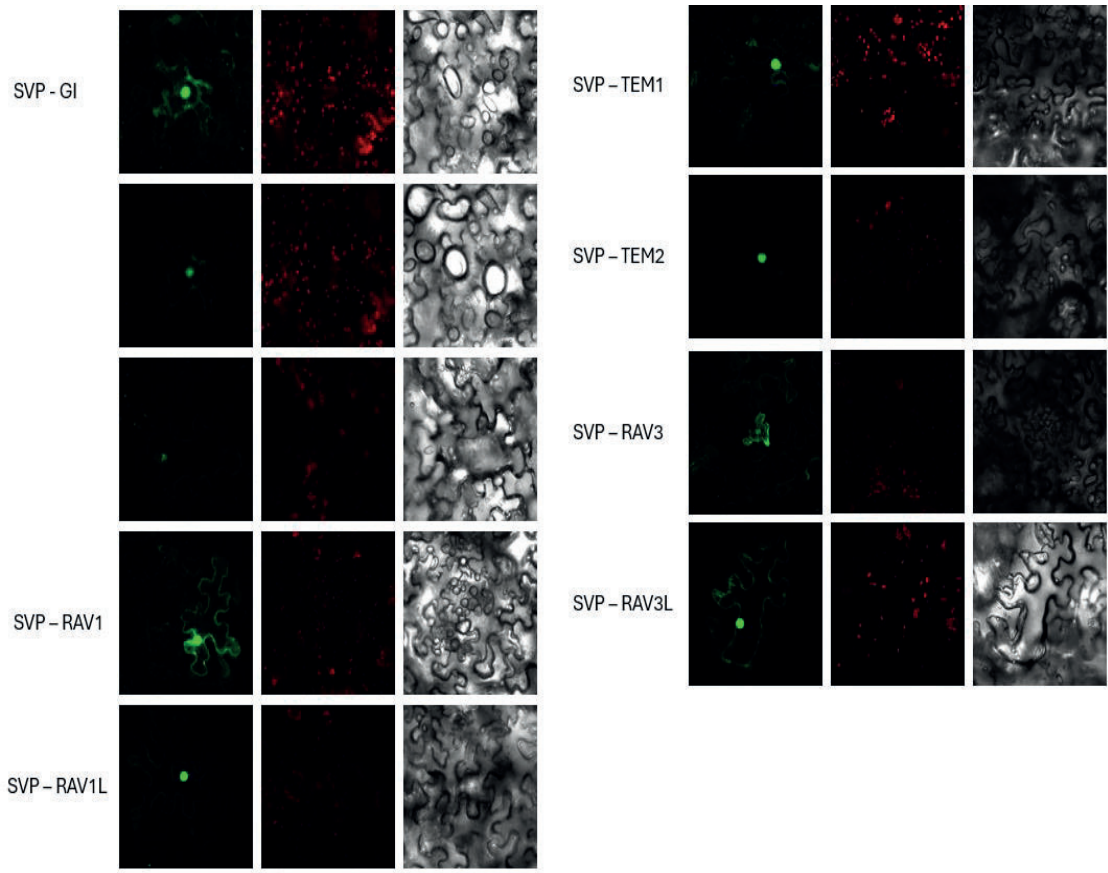
Figura 37Figura 37. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día corto

El promotor floral GI y los represores TPL y SVP interactúan físicamente con toda la familia RAV en Arabidopsis

Las proteínas RAV interaccionan físicamente con GI, TPL y SPV Como y se ha mencionado más arriba, se ha descrito que GI interacciona físicamente tanto con TEM como con SVP, seguramente inhabilitando su capacidad de reprimir *FT*. Además, estaba descrita la interacción del correpresor TPL con los TEM (Causier et al., 2012) pero se desconocía si estas interacciones se daban además con el resto de la familia RAV. Para

analizar esta posible interacción se realizó un experimento BiFC en el que se pudo detectar señal para las interacciones de GI con el todos los miembros de la familia RAV, RAV1, RAV1L, RAV3 y RAV3L y TEM1 y TEM2. También pudimos confirmar la interacción de GI con SVP y desvelar la interacción entre GI y TPL (Figura 38).

Por último, comprobamos que tanto SVP como TPL interaccionan físicamente con la totalidad de la familia RAV, mostrando una gran afinidad y potencial de interacción genética.



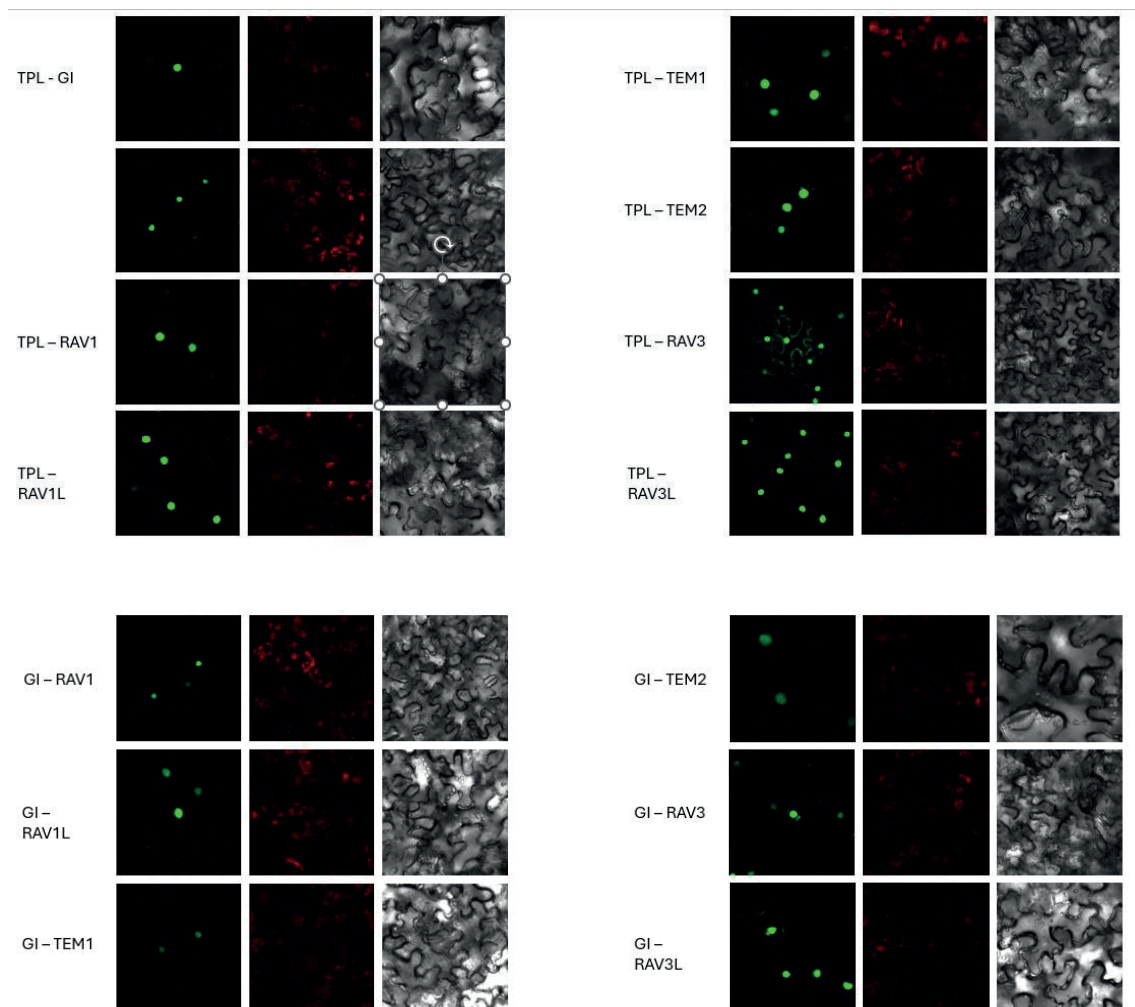


Figura 38. BiFC entre los miembros de la familia RAV, GI, SVP y TPL

La ausencia de *TEM* no es suficiente para recuperar el fenotipo WT en plantas *gi*

Una vez confirmada las interacciones físicas entre las proteínas TEM, GI, SVP, y TPL, se realizaron los cruces pertinentes para la obtención de líneas triple mutantes para *gi* y *tem1* y *tem2* (en adelante, *gi tem*) y cuádruples mutantes *gi*, *tem*, *svp* (en adelante *gi tem svp*) para analizar si el papel de GI en las respuestas a estrés es a través de las interacciones con TEM y SVP.

La ausencia de TEM no es suficiente para recuperar los niveles de expresión de FT en mutantes gi

En primer lugar, se midieron los niveles de expresión de los florígenos *FT* y *TSF* en LD, para poder evaluar si la ausencia del módulo GI-TEM impacta de algún modo en la inducción floral.

Los resultados mostraron que a las dos semanas tras la germinación las plantas *tem* presentan niveles muy elevados de ambos transcritos. Por el contrario, los niveles de expresión en las plantas *gi* y *gi tem* aún se mantienen inferiores a los que encontramos en las plantas WT (Figura 39).

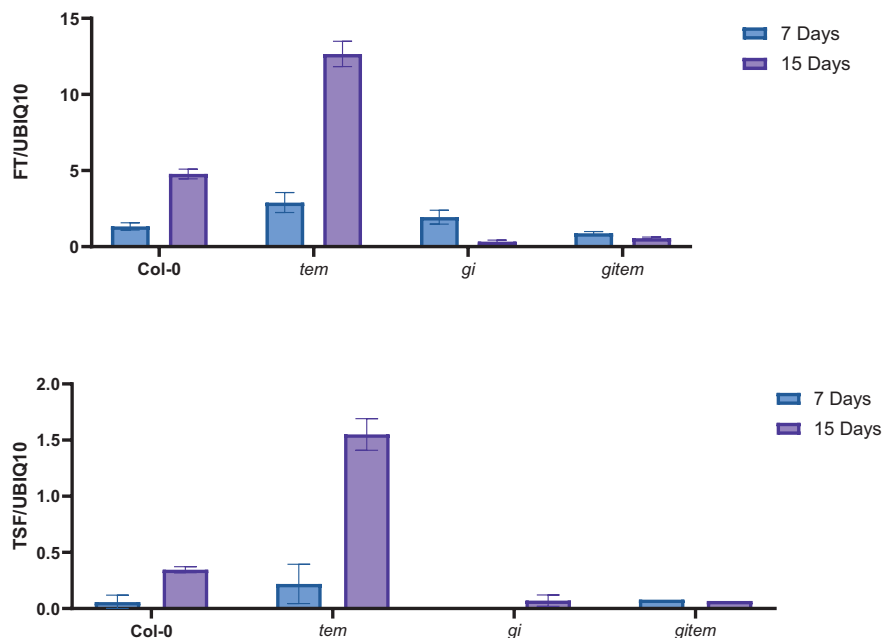


Figura 39. RT-qPCR del florígeno a dos tiempos en las cuatro líneas de interés.

La ausencia de niveles altos de *FT* o *TSF* a 7 o 15 días en las plantas *gi tem* indica que la ausencia del represor *TEM* no sería suficiente para recuperar el fenotipo WT, seguramente debido a la presencia de SVP.

La ausencia de *TEM* no es suficiente para recuperar el fenotipo WT en plantas *gi*. Las plantas *gi*, al carecer de uno de los principales promotores de la inducción floral en condiciones de LD, presentan una floración tardía. Las plantas triple mutante *gi tem* presenta una floración algo más temprana que los mutantes *gi*, pero muy alejada de la floración de los mutantes *tem* o del fenotipo salvaje de las plantas WT (Figura 40).

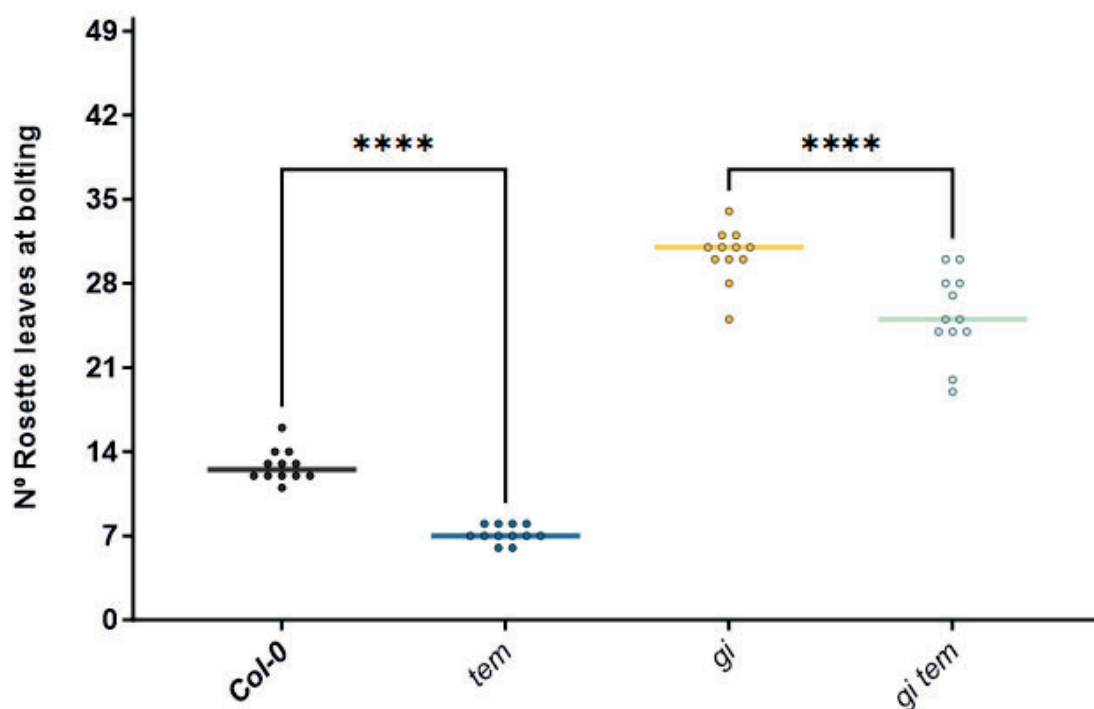


Figura 40. Número de hojas de roseta hasta la floración.

No obstante, cabe destacar que la ausencia de *tem* produce un adelanto similar en la floración de las plantas *gi* similar al adelanto que supone su ausencia respecto de las plantas WT. En ambos casos se traduce en una aceleración de unas 6 hojas. Lo que supone

una reducción de aproximadamente el 50% en el caso de las plantas WT y de aproximadamente un 20% en el caso de las plantas *gi*.

Por lo tanto, los resultados de expresión de *FT* y *TSF* son coherentes con los tiempos de floración con las plantas *gi tem*.

La acción de GI y TEM se debe a su interacción proteica y no a alteraciones en sus niveles de expresión

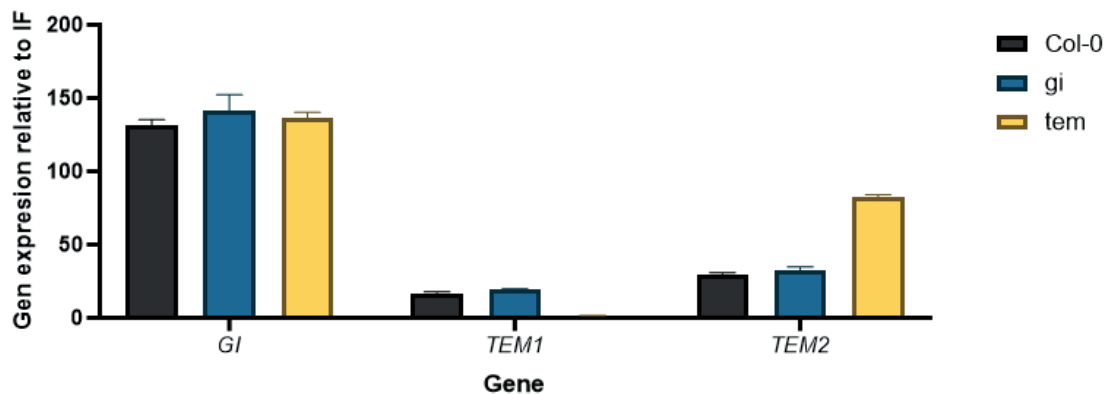


Figura 41. Niveles de expresión relativa a IFe4 de GI y TEM

Para evaluar si la aceleración de la inducción floral se debía a una regulación de la expresión génica, analizamos los niveles de expresión de *TEM1*, *TEM2* y *GI* en las líneas mutantes *tem* y *gi*. Los resultados indican que los niveles de expresión de los tres genes son similares tanto en las líneas mutantes *tem* y *gi* como en las plantas WT. Los niveles superiores de expresión de *TEM2* en las líneas *tem* pueden explicarse por el tipo de mutación que lleva el alelo. Se trata de una inserción de T-DNA que puede promover la expresión 5' del gen, donde aparean los oligos utilizados. No obstante, se trataría de una versión truncada de *TEM2*, de modo que la proteína expresada no podría realizar la función normal de *TEM2*.

Estos resultados nos estarían indicando que la interacción genética que encontramos en el triple mutante *gi tem* probablemente se deba más a una interacción proteica que a una regulación de la expresión de estos genes.

La ausencia de gi retrasa la floración de los mutantes tem a la salinidad

Tal y como se ha presentado en secciones previas, en condiciones de salinidad las plantas WT experimentan un retraso generalizado del crecimiento y, en particular, de la inducción floral, sin embargo, los mutantes *tem* parecen ser insensibles. Las plantas *gi*, muestran este mismo retraso en la inducción floral que las plantas WT, con el agravante de que, en las condiciones de salinidad más extremas, mueren antes de la transición a la floración. En las plantas *gi tem* observamos este mismo fenómeno, reforzando la idea de que la ausencia de TEM no es suficiente para compensar el efecto que la ausencia de GI tiene en la inducción floral en respuesta a estrés salino (Figura 42).

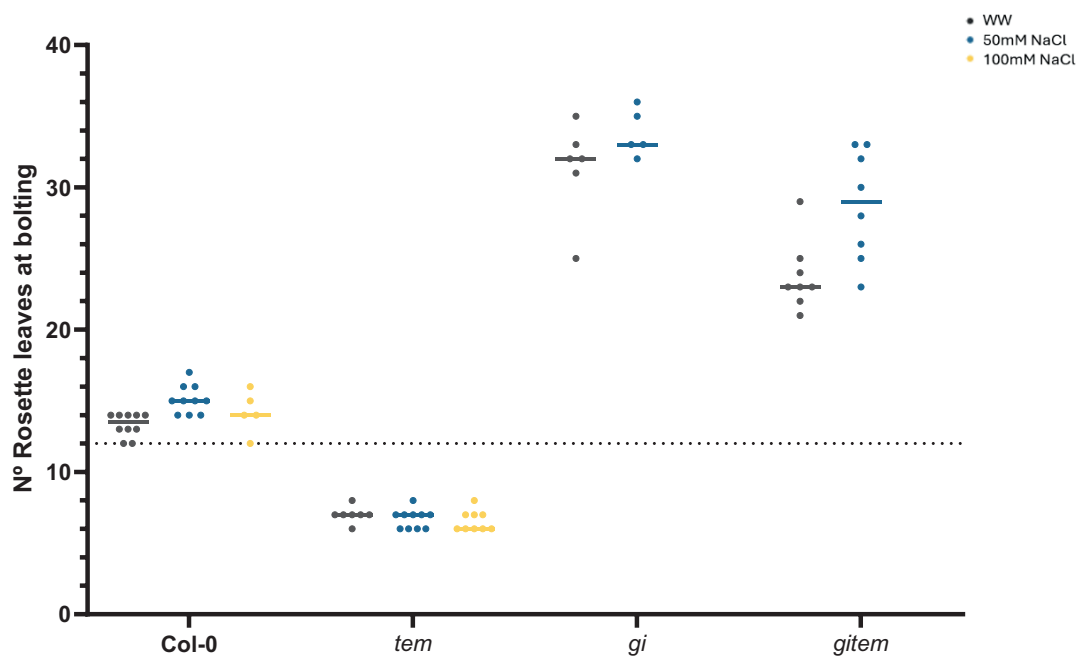


Figura 42. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día largo en condiciones crecientes de salinidad.

La ausencia de gi y tem podría otorgar cierta resistencia a la salinidad

Los genes SOS desempeñan un papel crucial en la respuesta a la salinidad en las plantas al evitar la acumulación de altas concentraciones de Na⁺ en su interior, y su regulación se ve mediada por la acción de GI (W.-Y. Kim et al., 2013).

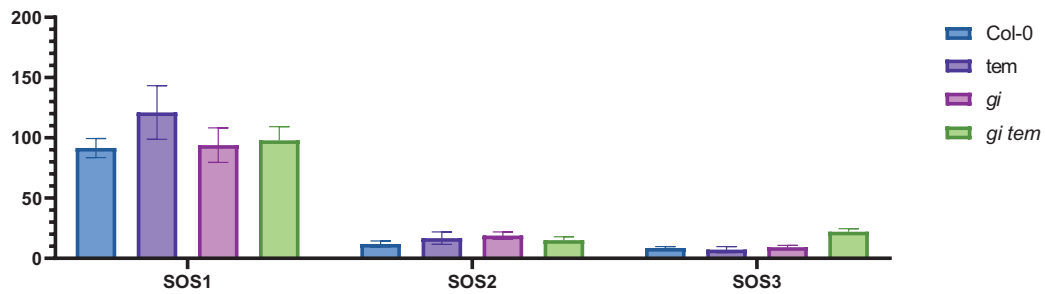


Figura 43. Niveles de expresión de los genes SOS1, SOS2 y SOS3 en plantas gi tem

Los niveles de expresión de los genes *SOS* no parecen variar en exceso entre los distintos genotipos, a excepción de *SOS3*, que se encuentra más expresado en las plantas *gi tem*. Esto podría implicar una mejor capacidad de respuesta al estrés salino, aunque insuficiente para alcanzar la inducción floral en condiciones de alta salinidad (Figura 43).

La ausencia de TEM en mutantes gi provoca un adelanto de la floración incluso en SD

En condiciones de día corto *tem* mantiene un ligero adelanto en la floración respecto de WT. Aunque los mutantes *gi* florecen en SD igual que en LD, el triple mutante *gi tem* florece antes que los mutantes *gi*, pero el retraso en la floración continúa siendo significativo respecto de las plantas WT (

Figura 44).

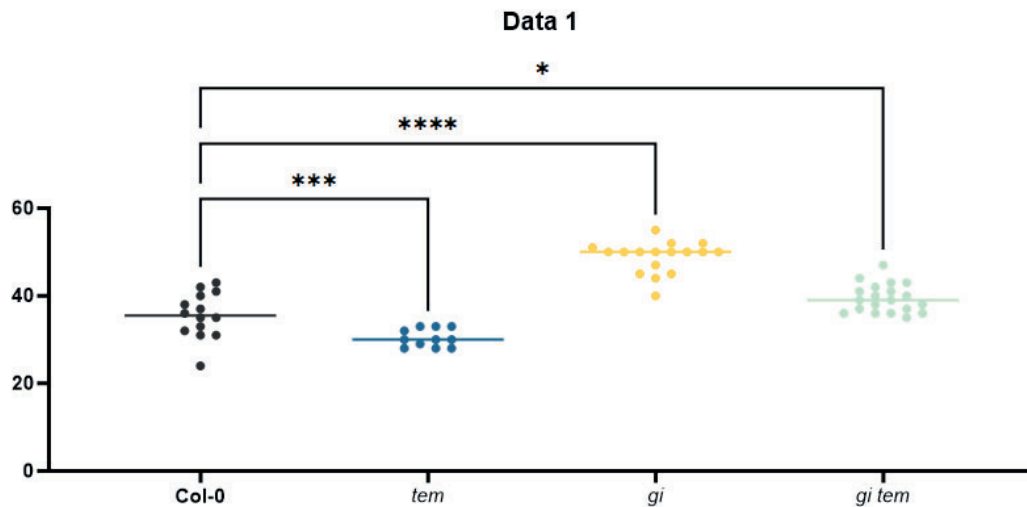


Figura 44. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día corto.

La ausencia de TEM en plantas mutantes gi recuperan el mecanismo de escape a la sequía en condiciones de día largo

En condiciones de día largo, las plantas *gi tem* no solo llegan a florecer en las dos condiciones de sequía, sino que además adelantan la inducción floral en igual proporción que las plantas WT. De modo que la ausencia de *TEM*, pese a no recuperar el tiempo de floración WT, sí libera la respuesta de escape ante la sequía, ausente en mutantes *tem* (Figura 45).

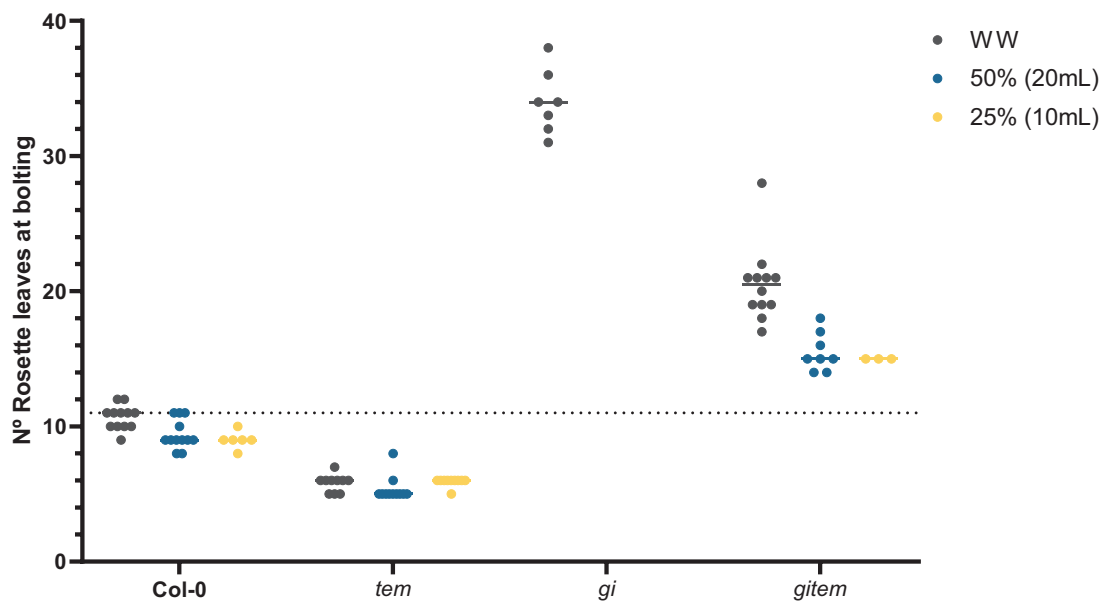


Figura 45. Número de hojas de roseta en el momento de la floración en día largo.

Rol de módulo GI/TEM/SVP en estrés abiótico

Una vez comprobado que el módulo GI-TEM tiene un papel en la inducción floral en respuesta al estrés abiótico, pero que la ausencia combinada del inductor floral *GI* y de los represores *TEM* es insuficiente para recuperar el fenotipo de floración WT, se decidió explorar si *SVP* es el componente adicional a través del que *GI* realiza su función.

La expresión de SVP no varía en las plantas mutantes gi y tem

En primer lugar, se determinaron los niveles de expresión de *SVP* a 7 y 15 días para comprobar si las plantas mutantes *gi tem* mostraba algún cambio respecto de las plantas WT o los mutantes *tem* y *gi*.

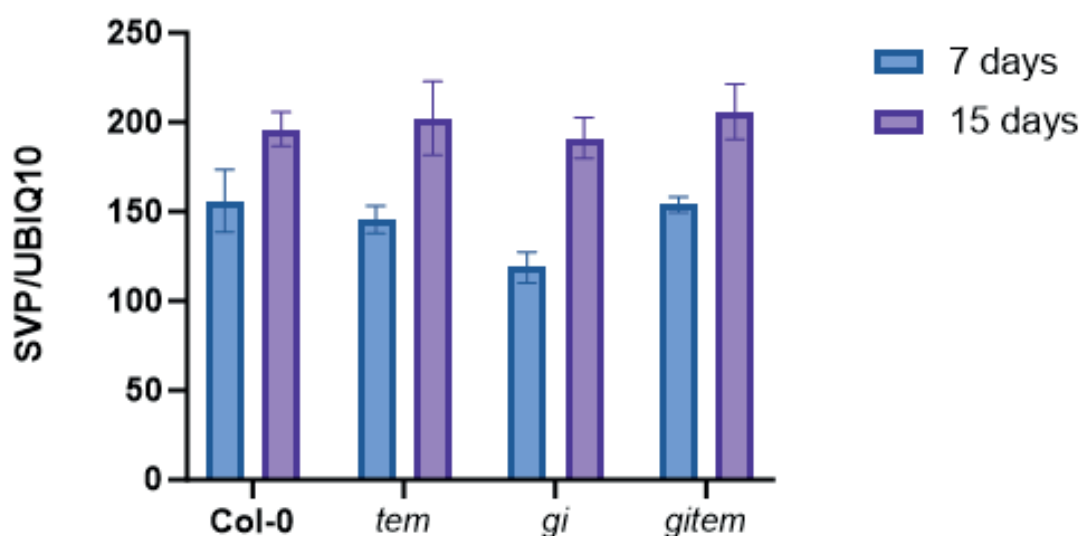


Figura 46. Niveles de expresión de SVP en los diferentes mutantes.

Los resultados mostraron niveles similares de expresión en todas los genotipos, con un incremento esperado a 15 días respecto de la muestra recogida a 7 días. Estos resultados indican que la regulación del módulo GI-TEM-SVP, no ocurre por una regulación de la expresión, sino que, en todo caso, sería debida a la interacción previamente observada entre las proteínas (Figura 46).

La ausencia de SVP y de TEM en mutantes gi resulta en un tiempo de floración WT

El estudio de los tiempos de floración permitió comprobar que los mutantes *svp tem* florecen prácticamente al mismo tiempo que los mutantes *tem*. Por otra parte, las plantas *gi svp* presenta una floración tardía respecto de las plantas WT, pero en todo caso acelerada respecto de las plantas *gi* y *gi tem*, presentando una recuperación parcial del fenotipo de floración. Finalmente, las plantas *gi tem svp* florecen en el mismo punto que las plantas WT, mostrando una recuperación total del fenotipo de floración e indicando que en ausencia de los represores TEM y SVP elimina el retraso que normalmente provoca la ausencia de GI (Figura 47).

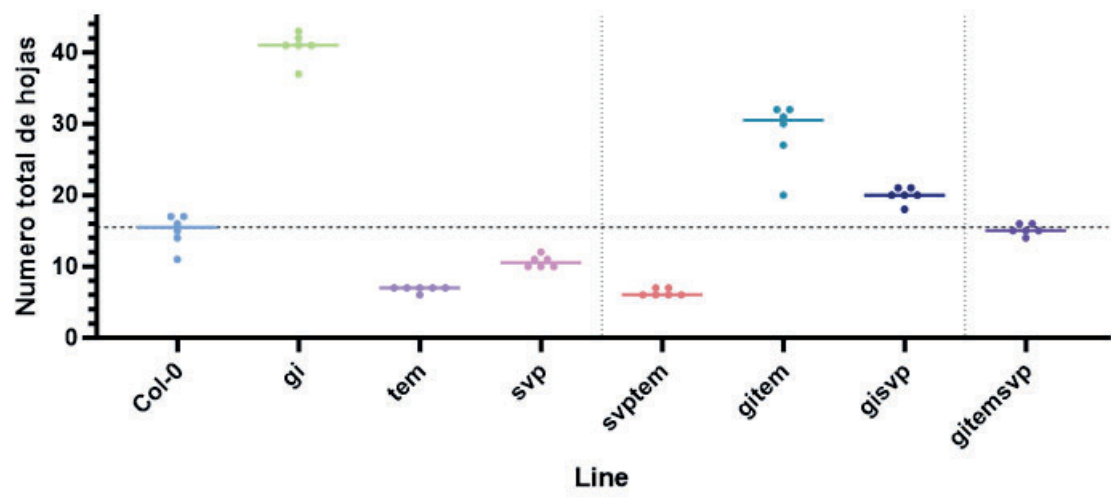


Figura 47. Experimento de floración en LD de las plantas gi tem svp.

La ausencia de GI y SVP anula la ventaja de tem en respuesta a salinidad

Las semillas de los diferentes mutantes se sometieron a un experimento de germinación en condiciones de salinidad para detectar su sensibilidad a este estrés (Figura 48).

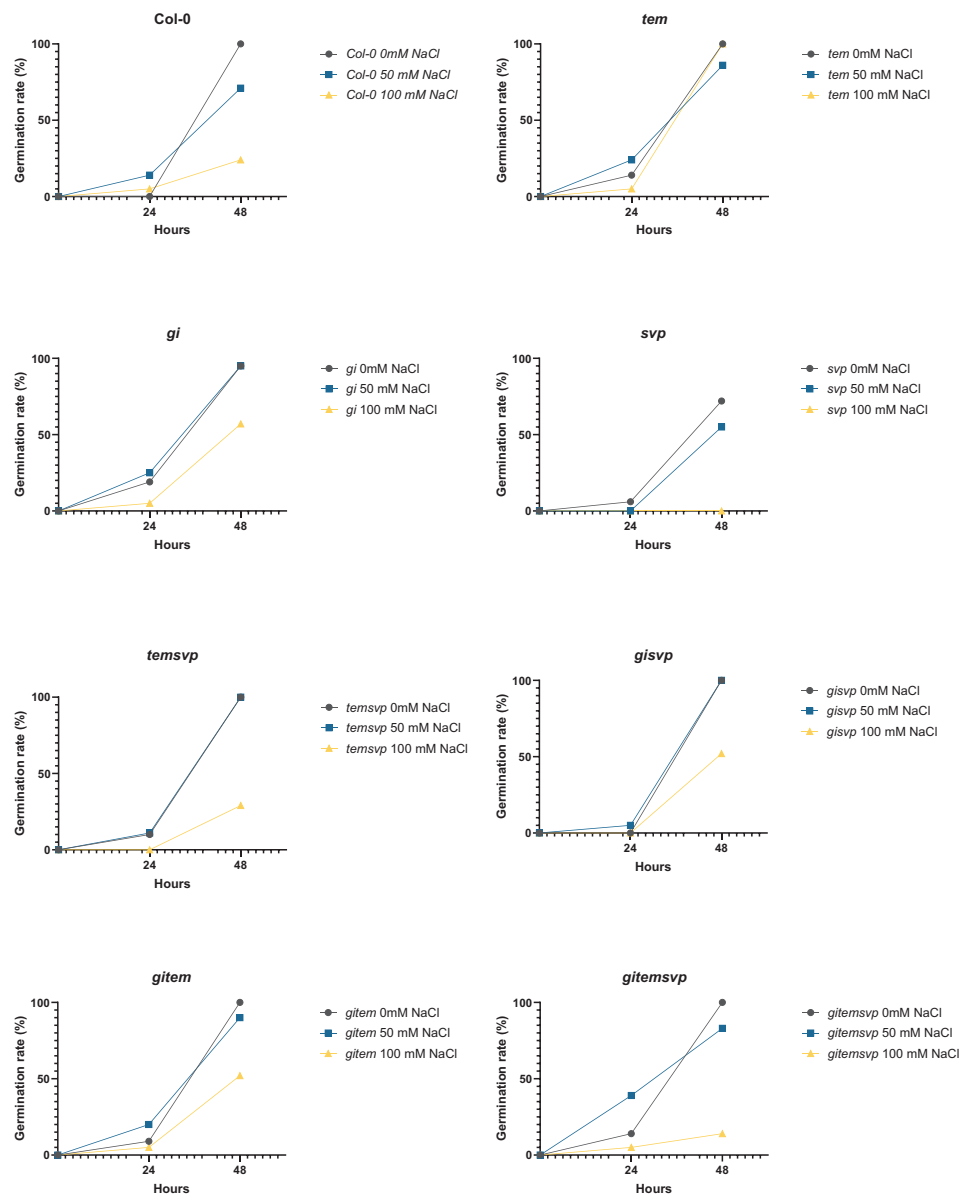


Figura 48. Tasa de germinación en condiciones de salinidad.

Tal y como se había detectado previamente, los mutantes *tem* son insensibles a la presencia de sal en el medio, sin embargo, la tasa de germinación de los mutantes *svp* disminuye con el aumento de la concentración de NaCl y parecen ser más sensibles a la salinidad que las plantas WT, especialmente a 100mM de NaCl. Los mutantes *gi* muestran una disminución en la germinación con el aumento de NaCl, similar al tipo silvestre; sin embargo, parece que la tasa de germinación a 50mM no se reduce tanto como en las plantas WT, lo que podría indicar una tolerancia ligeramente mayor a niveles bajos de salinidad.

En el resto de mutantes se detecta una tendencia similar al WT, señalando que, si bien la ausencia puntual de *TEM* (*tem*) otorga una ventaja en cuanto a la germinación en suelos salinos, la ausencia combinada con la de *GI* (*gi tem*) o con la de *GI* y de *SVP* (*gi tem svp*) anula esa ventaja. Es decir, el efecto que la ausencia de *TEM* tiene sobre la insensibilidad a la presencia de sal requiere de la presencia de *GI* y *SVP* para que ocurra.

gi tem svp se comporta como WT en LD en sequía

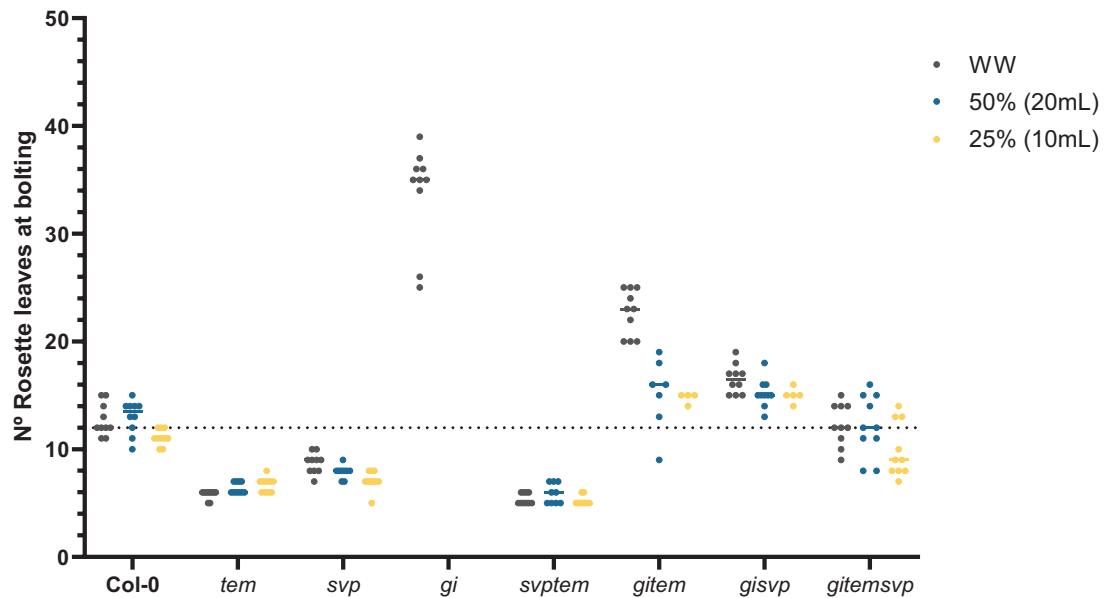


Figura 49. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración en *Arabidopsis thaliana*

Condiciones de riego control (WW) y estrés por sequía (50% y 25% de agua) en LD. Los distintos genotipos incluyen el tipo silvestre Col-0 y mutantes específicos (tem, svp, gi, gi tem, tem svp, gi tem svp)

Las plantas WT muestran capacidad de escape a la sequía adelantando la floración al disminuir la disponibilidad de agua. Por otro lado, los mutantes *gi* muestra una floración muy tardía y al carecer de mecanismos de escape a la sequía, las plantas mueren antes de que puedan florecer. Las plantas *tem* y *svp tem* no muestran sensibilidad a la sequía, manteniendo un número constante de hojas de roseta al momento de la floración, independientemente de la severidad de la sequía. En cambio, las plantas WT, *svp*, *gi tem*, *gi svp* y *gi tem svp* demuestran una notable capacidad de escape a la sequía, con capacidad para florecer sin importar la restricción hídrica. Finalmente, el tiempo de floración y la respuesta al estrés por sequía de *gi svp tem* es similar al de las plantas WT, un poco más pronunciada la respuesta a la sequía (Figura 49).

La ausencia de TEM y SVP es suficiente para recuperar el escape a sequía

Como ya se ha mencionado el mecanismo de escape a la sequía se produce en LD y no en SD. Efectivamente, observamos en la Figura 50 que las plantas WT, ni las plantas *gi*, no cuentan con dicho mecanismo. De hecho, las plantas WT mueren antes de poder florecer en condiciones de sequía severa, hecho que se observa también en las condiciones de sequía moderada para las plantas *gi*. Las plantas mutantes *tem* o *tem svp*, aunque presentan una floración temprana, tampoco la adelantan ante la reducción de riego (igual que ocurre en LD)

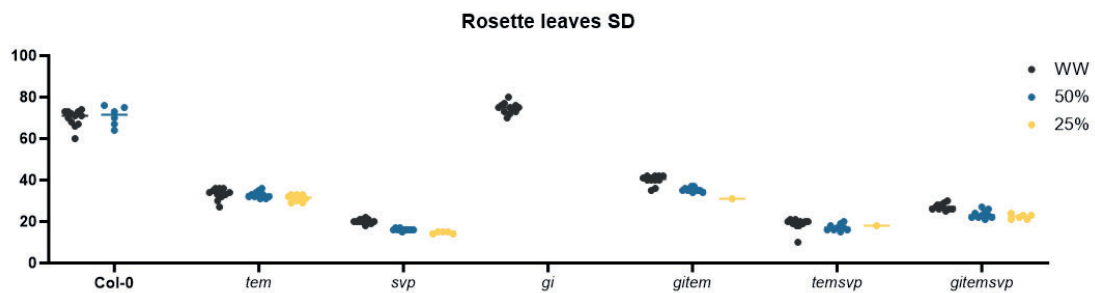


Figura 50. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración en *Arabidopsis thaliana*

en condiciones de riego control (WW) y estrés por sequía (50% y 25% de agua) en SD. Los mutantes incluyen el tipo silvestre Col-0 y mutantes específicos (*tem*, *svp*, *gi*, *gi tem*, *tem svp*, *gi tem svp*)

Sin embargo, la eliminación de *SVP* (*svp*) o la de *TEM* y *SVP* en un fondo *gi* (*gi tem*, *gi tem svp*) provoca la aparición de dicho mecanismo de escape a la restricción de agua pese a estar en condiciones de SD.

Las bajas temperaturas inhiben el escape a sequía en los mutantes gi tem svp

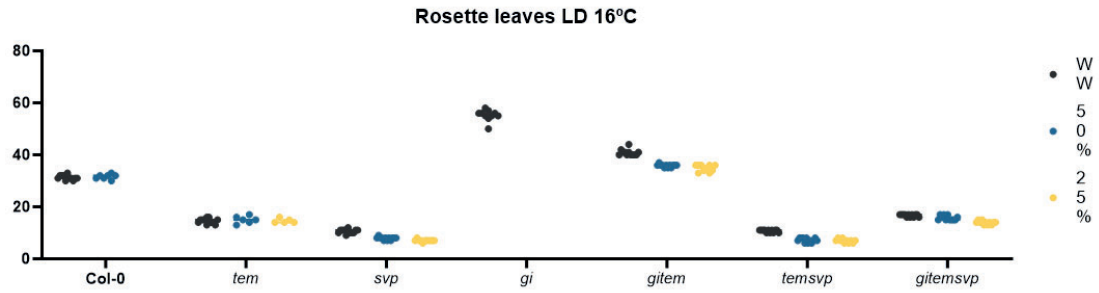


Figura 51. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración en *Arabidopsis thaliana*

En condiciones de riego control (WW) y estrés por sequía (50% y 25% de agua) en LD y 16°C. Los mutantes incluyen el tipo silvestre Col-0 y mutantes específicos (tem, svp, gi, gi tem, tem svp, gi tem svp)

De manera generalizada, el crecimiento en condiciones de día LD y 16°C produce un retraso del desarrollo que se ve reflejado en la inducción floral. Así, las plantas WT florecen más tarde que a 22°C y pierden la capacidad de activar el escape a sequía. Las plantas *tem* y *svp* presentan un retraso en la floración, pero menor que el observado en SD (Figura 50) y el escape observado en las plantas *gi tem svp* es menos acusado que a 22°C (Figura 51).

Estos resultados indicarían que, a diferencia de lo observado en los mutantes *gi tem*, la ausencia de SVP combinada con la ausencia de TEM es suficiente para la recuperación del fenotipo de inducción floral WT en plantas *gi*, reflejando que el papel que GI juega como promotor del DE vendría dado por su actuación como represor de represores de la inducción floral.

Evolución de los RAV

La agrupación de los genes RAV no permite anticipar su función reguladora

Durante los últimos años se han realizado amplios avances en la implicación de los genes RAV en respuesta al estrés abiótico (Fu et al., 2014; X.-J. Li et al., 2015; Mittal et al., 2014). La revisión bibliográfica permitió la identificación de las secuencias RAV de 29 especies asociadas de algún modo a la regulación al estrés abiótico (Figura 63).

Con la intención de detectar posibles agrupaciones que señalaran una conservación de la secuencia asociada a la función en respuesta a salinidad, se realizó un árbol filogenético de los genes *RAV* asociados a algún tipo de estrés biótico y abiótico.

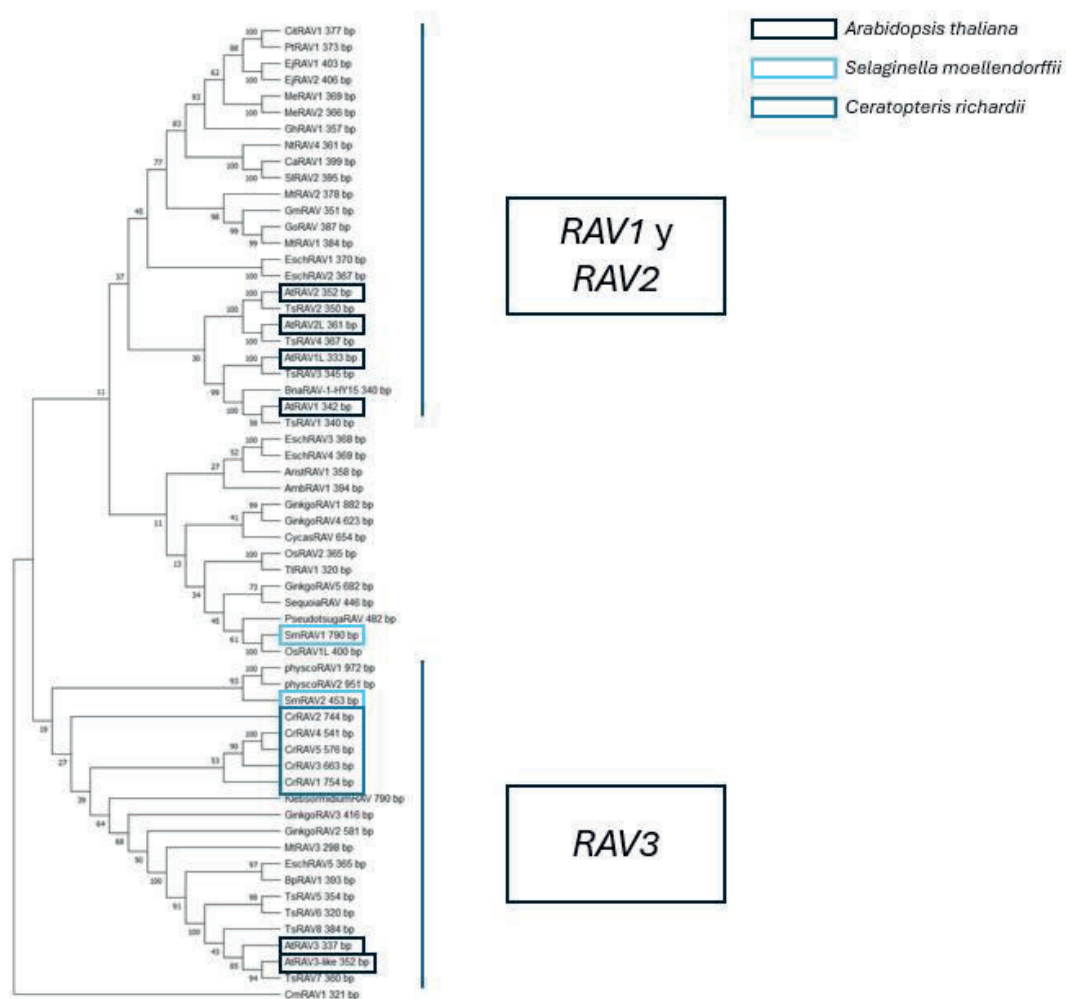


Figura 52. Árbol filogenético de los genes *RAV* con alguna implicación en estrés abiótico identificada en la literatura.

Las agrupaciones detectadas en el árbol filogenético reflejan la clasificación conocida de los genes *RAV* en tres grupos, pero descartan la agrupación funcional asociada a los roles conocidos en estrés abiótico.

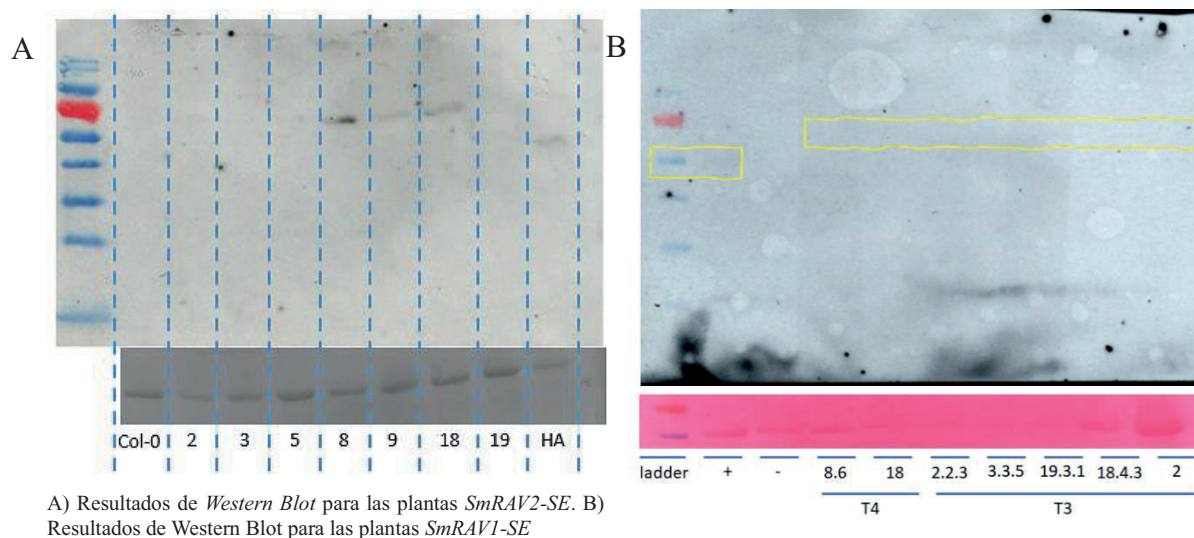
Los genes SmRAV conservan la capacidad de regular la inducción floral en Arabidopsis

Selaginella moellendorffii es una planta licofita, carente de semillas y con vasculatura no ramificada, siendo un representante basal de la historia evolutiva de las plantas. La publicación del genoma de *Selaginella moellendorffii* (Banks et al., 2011) permitió la identificación de 2 genes RAV en (*SmRAV1* y *SmRAV2*) y su posterior clonaje para su estudio.

Para estudiar si los genes *SmRAV1* y *SmRAV2* conservan la función reguladora de la inducción floral se generaron líneas transgénicas bajo el promotor 35S y fueron llevados hasta la generación T₃ en busca de individuos homocigotos.

Con el objetivo de seleccionar las líneas con mayor expresión se realizaron western blots (WB) de líneas transgénicas independientes T₃ y T₄ contra el TAG HA.

Figura 53. Expresión de las proteínas SmRAV en líneas T₃ y T₄ de *Arabidopsis*.



La acumulación de la proteína SmRAV2 correlaciona con el fenotipo de inducción floral, pero no en SmRAV1

Como se aprecia en la Figura 53, únicamente se detectó señal en las líneas 8, 9 y 18 de las plantas *SmRAV2-SE* y ninguna línea mostró acumulación de la proteína *SmRAV1-SE*.

Dado que la ausencia de detección puede deberse a diferentes factores más allá de la falta de expresión, como por ejemplo una rápida degradación de las proteínas, decidimos realizar los siguientes experimentos con todas las líneas con independencia del resultado de WB.

La expresión de SmRAV2 retrasa la floración en Arabidopsis

Dado que *Selaginella moellendorffii* no cuenta con flores como órgano reproductor, nos preguntábamos si la expresión de sus genes *RAV* podría tener algún efecto sobre la inducción floral en plantas que sí las tienen. Así, la investigación sobre la expresión de los genes *RAV* de *Selaginella moellendorffii* podría arrojar luz sobre los mecanismos genéticos conservados que afectan a la floración, sugiriendo un papel de estos genes en la regulación del desarrollo reproductivo vegetal, más allá de la presencia de las flores.

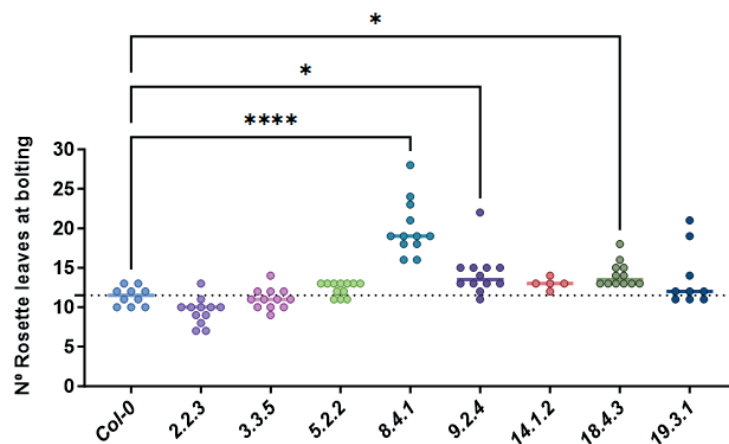


Figura 54. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración de plantas *Arabidopsis thaliana* SmRAV2-SE en LD

Como se refleja en el Figura 54, la expresión de *SmRAV2* en LD provoca un marcado retraso en la inducción floral respecto de las plantas WT, más acentuado en las plantas de la línea 8 que habían mostrado una mayor acumulación de proteína Figura 53, mientras que las plantas de las líneas 9 y 18 experimentan un retraso de la floración menor.

Si bien este retraso no es generalizado en todas las líneas analizadas, la correlación de los niveles de expresión con el fenotipo de retraso del tiempo de floración proporciona una mayor confianza en la veracidad del resultado, indicando que la expresión de un gen *RAV* basal, como es el *SmRAV2*, es suficiente para regular la inducción floral.

La expresión de SmRAV1 acelera la inducción floral en Arabidopsis

En cambio, pese a no haberse detectado expresión proteica en el WB (Figura 53), las diferentes líneas independientes *SmRAV1-SE* presentan consistentemente un adelanto de la floración en comparación a WT, indicando que el resultado observado es genuino debido a la expresión generalizada de *SmRAV1* y no es consecuencia del lugar de inserción del T-DNA (Pucker et al., 2021).

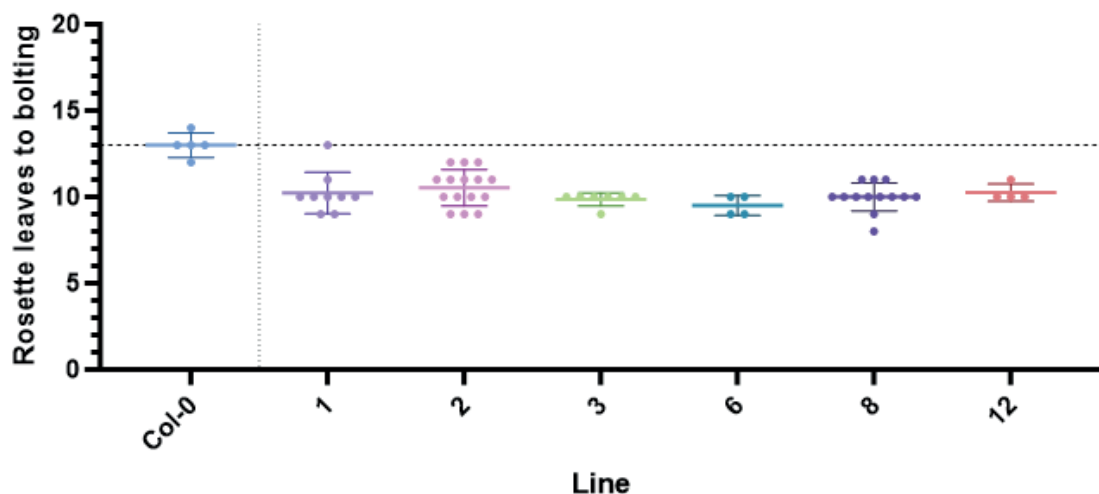


Figura 55. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración de plantas de *Arabidopsis thaliana* *SmRAV2-SE* en LD

Estos resultados muestran que tanto *SmRAV1* como *SmRAV2* alteran la regulación de la inducción floral al ser expresados en *Arabidopsis*. *SmRAV2* actúa como *TEM*, produciendo un retraso de la floración, mientras que *SmRAV1* la adelanta la inducción floral, indicando que los genes *RAV* conservarían la capacidad de regular la inducción floral desde los momentos más basales de la evolución vegetal.

Las proteínas SmRAV interaccionan con el activador GI y el represor TPL de Arabidopsis, pero únicamente SmRAV1 interacciona con SVP.

Como se ha mostrado en experimentos anteriores, las proteínas RAV interaccionan físicamente con GI, SVP y TPL (Figura 38). Dado que los genes *SmRAV* tienen la capacidad de regular la inducción floral en *Arabidopsis*, nos preguntamos si las proteínas codificadas por estos genes también tendrían la capacidad para interaccionar con las proteínas GI, SVP y TPL.

Tal y como se ve en (Figura 56), tanto *SmRAV1* como *SmRAV2* interaccionan GI y con TPL, promotor y represor de la floración respectivamente. No obstante, únicamente *SmRAV1* parece interaccionar con SVP, ya que no se ha detectado señal para la interacción *SmRAV2*-SVP.

Dado que *SmRAV1* parece tener una función promotora de la inducción floral en *Arabidopsis*, a diferencia de *SmRAV2*, que la retrasa, este resultado plantea la hipótesis de si la presencia de *SmRAV1* podría estar impidiendo la represión que SVP ejerce sobre la inducción floral.

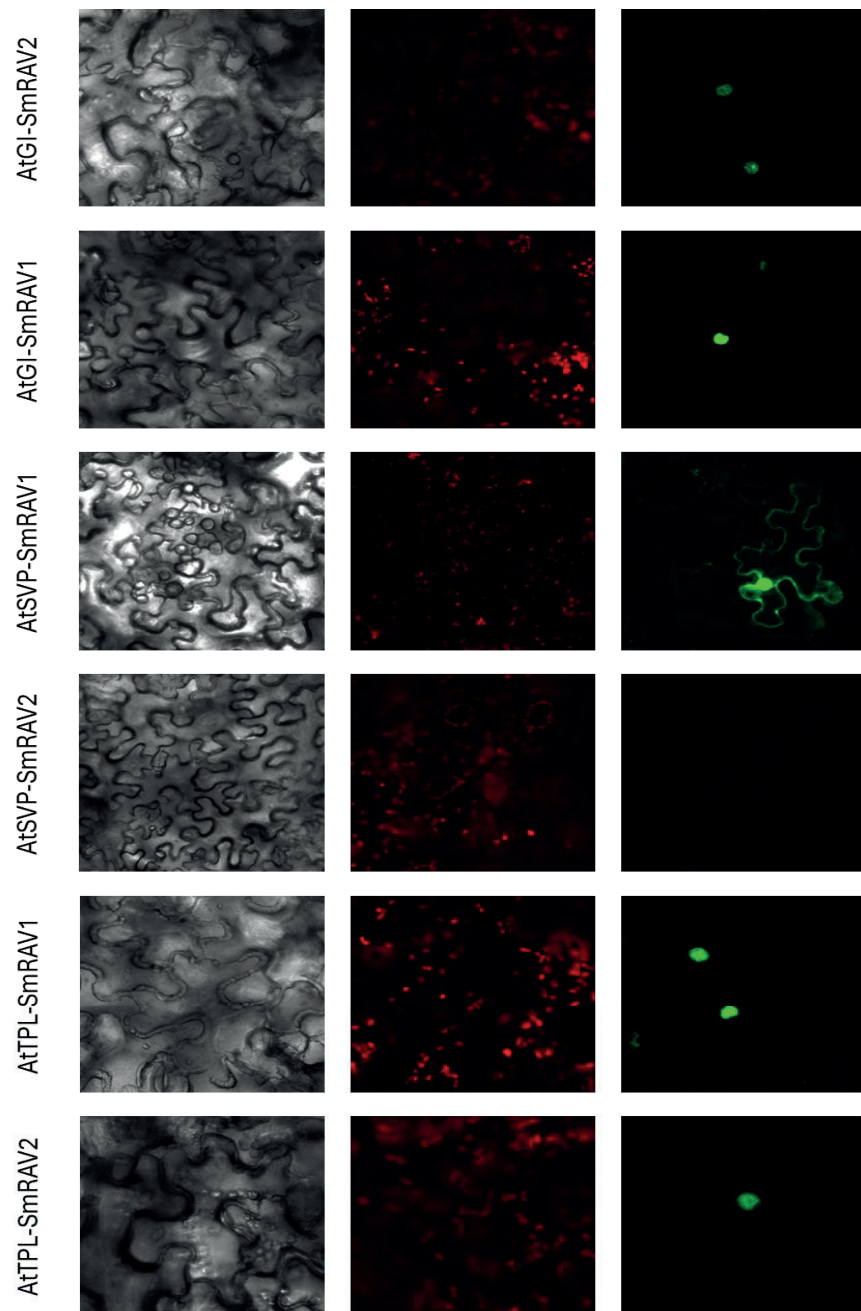


Figura 56. Análisis BiFC de los interactores de SmRAV

Los genes CrRAV provocan un retraso consistente en la floración

Ceratopteris richardii se encuentra evolutivamente más próximo a *Arabidopsis* que *Selaginella moellendorffii*, pero aún carece de flores como órgano reproductor. La reciente publicación de su genoma (Marchant et al., 2019) permitió la identificación y clonación de sus 5 genes *RAV* para el estudio del rol que la expresión de estos genes en *Arabidopsis* pudiera tener sobre el proceso de inducción floral.

Una vez clonados los genes los expresamos constitutivamente en *Arabidopsis* usando el promotor 35S, pudimos analizar el tiempo de floración de las plantas que sobre-expresan los genes *CrRAV3*, *CrRAV4* y *CrRAV5*. En todos los casos se apreció un claro atraso de la floración respecto de las plantas WT (Figura 57).

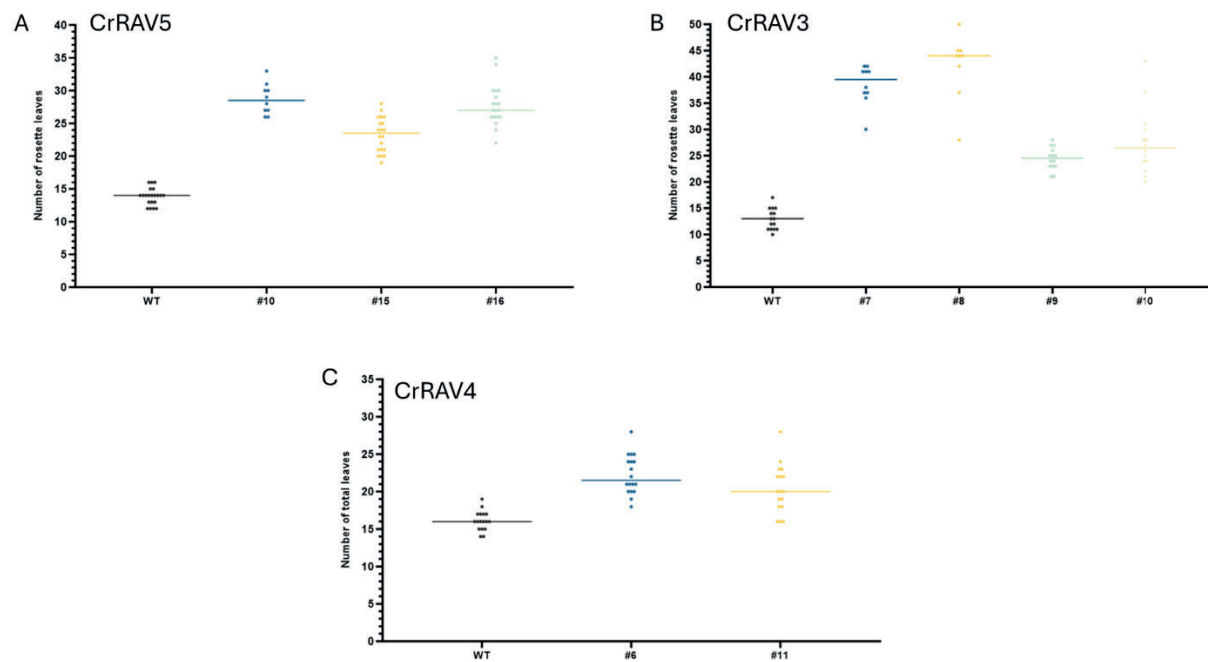


Figura 57. Número de hojas vegetativas producidas antes de la floración de líneas independientes de plantas *Arabidopsis thaliana* CrRAV-SE en LD

A). Resultados de floración de tres líneas *CrRAV5-SE*, B) Resultados de floración de tres líneas *CrRAV3-SE* C) Resultados de floración de tres líneas *CrRAV4-SE*

Junto a los resultados obtenidos para los genes *SmRAV*, estos resultados confirman una fuerte conservación de la capacidad reguladora de la transición floral de los genes *RAV* incluso de representantes basales de la evolución vegetal.

La expresión de los RAV en Ceratopteris richardii varía en función de su etapa del desarrollo

Una vez establecida la función de los *CrRAV* en *Arabidopsis*, quisimos explorar el rol que estos genes juegan en su planta nativa.

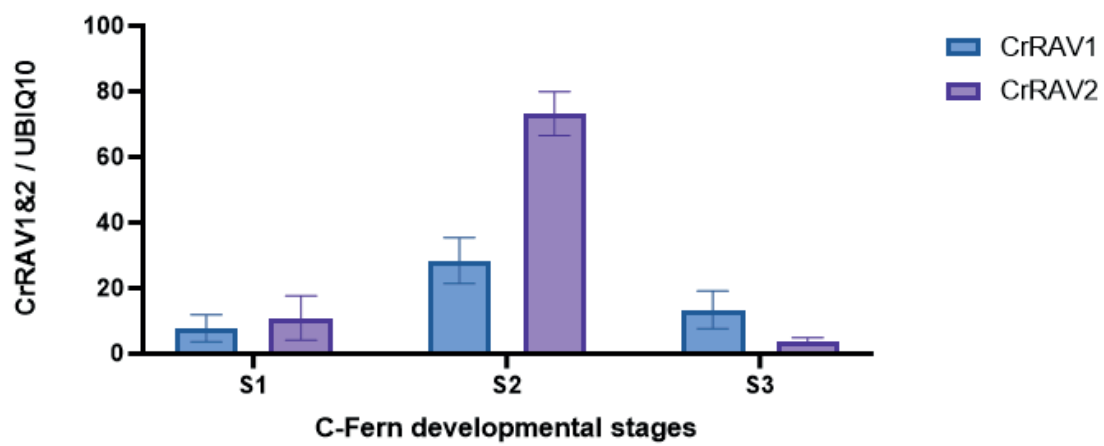


Figura 58. Expresión de *CrRAV1* y 2 en diferentes puntos del desarrollo.

S1. Transición del gametofito a esporofito. S2. Esporofito de hoja vegetativa. S3. Esporofito de hoja fértil

Un primer análisis de expresión en tres puntos clave de su desarrollo (S1, transición del gametofito a esporofito; S2, Hoja vegetativa del esporofito; S3, Hoja fértil del esporofito) reveló que la expresión de *CrRAV1* y *CrRAV2* alcanza un pico de expresión (de mayor nivel para *SmRAV2*) en relación con las otras dos fases en el momento previo a la transición reproductiva del esporofito (Figura 58).

Unificando los resultados de plantas con flor y sin flor podemos concluir que los genes *RAV*, podrían actuar como reguladores de la transición a la etapa reproductiva, más allá de la regulación de la inducción flora, coordinando el cambio de etapa vital en respuesta a las condiciones ambientales.

Los genes RAV presentan una expresión diferencial durante el desarrollo de los gametofitos

Los gametofitos de C-fern se desarrollan principalmente como hermafroditas (Banks, 1999), no obstante, una alta concentración de gametofitos en el medio induce el desarrollo de los gametofitos como machos. Es por esto que, usando una menor concentración de esporas se logra el desarrollo de la totalidad de los gametofitos como hermafroditas.

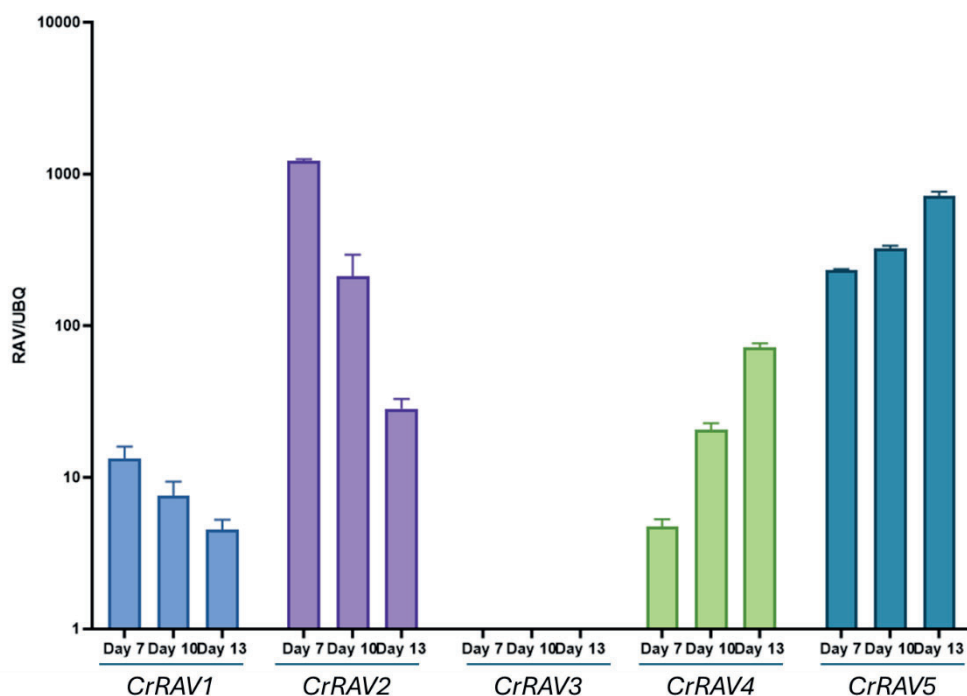


Figura 59. Expresión de *CrRAV* a días 7, 10 y 13 tras la germinación.

Los resultados de expresión en gametofitos a los días 7 (fase vegetativa), 10 (madurez reproductiva) y 13 (post-autofecundación) se puede apreciar la dinámica de expresión (Figura 59).

Podemos observar que aparecen tres patrones diferentes. Por un lado, *CrRAV1* y *CrRAV2* disminuyen su expresión según avanza el desarrollo. Por otro lado, *CrRAV4* y *CrRAV5* aumentan su expresión. Finalmente, no se detectó señal para *CrRAV3* en ninguno de los momentos muestreados.

Estos resultados podrían indicar un rol diferencial entre los genes *CrRAV1* y *CrRAV2* y los genes *CrRAV4* y *CrRAV5*.

Los genes RAV presentan una expresión diferencial en gametofitos hermafroditas y machos

Una vez establecida la expresión diferencial entre los genes *CrRAV1* y *CrRAV2* y *CrRAV4* y *CrRAV5* en gametofitos hermafroditas nos preguntamos si podrían estar implicados en la regulación del establecimiento del sexo en los gametofitos.

Para probar esta hipótesis comparamos los niveles de expresión en gametofitos hermafroditas y una muestra de gametofitos enriquecida en machos, antes y después de la autofecundación.

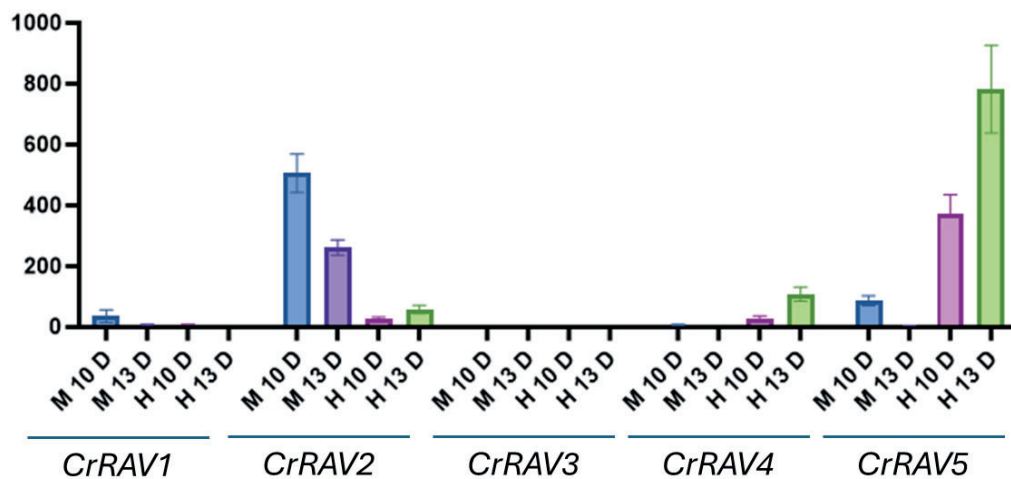


Figura 60. Comparación de expresión de los genes *CrRAV* en gametofitos Machos y Hermafroditas a 10 y 13 días.

Al comparar los niveles de expresión de *CrRAV* entre machos y hermafroditas a 10 y 13 días, se pudo comprobar que la expresión de *CrRAV1* y *CrRAV2* es superior en machos y, que, por el contrario, la expresión de *CrRAV4* y *CrRAV5* es superior en los gametofitos hermafroditas (Figura 60). Destacan claramente con niveles de expresión diferenciados, *CrRAV2* en gametofitos macho y *CrRAV5* en hermafroditas.

Tras los análisis de expresión mediante RT-qPCR, quisimos analizar la expresión de los genes *RAV* *in situ* en tejidos de dos fases diferentes del desarrollo, en la hoja fértil y en la transición gametofito-esporofito.

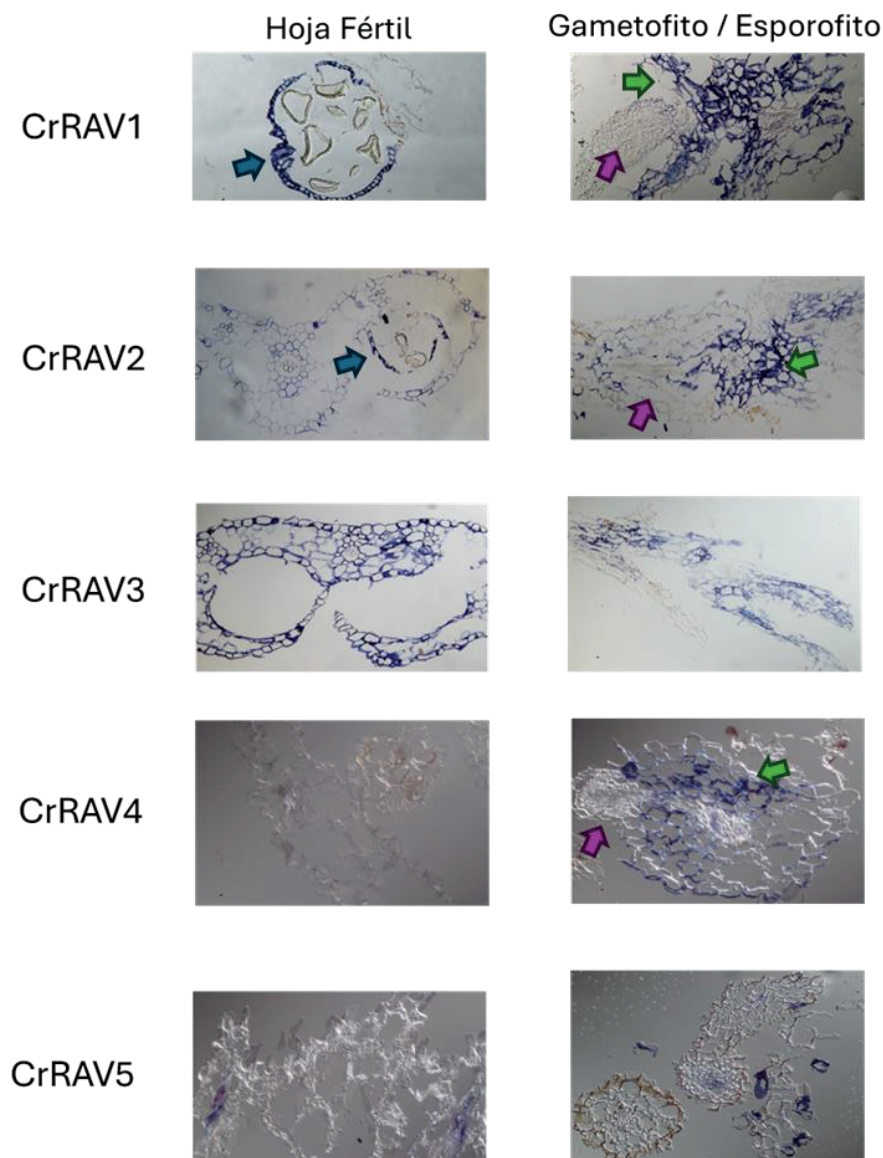


Figura 61. Expresión de los genes CrRAV en Ceratopteris richardii

Se muestran los resultados de Hoja fértil (izquierda) y de la transición de gametofito a esporofito (derecha). Las flechas azules indican el tejido externo del esporangio. Las flechas azules indican el tejido de gametofito. Las flechas moradas indican el tejido del embrión del esporofito.

Los genes *CrRAV4* y *CrRAV5* no parecen expresarse en la hoja fértil, pero se expresan durante el desarrollo del gametofito. Por su parte, *CrRAV1* y *CrRAV2* acumulan señal en torno al esporangio, pudiendo cumplir alguna función en la regulación del desarrollo de este o de las esporas. *CrRAV3* presenta una señal generalizada, en contradicción con los resultados obtenidos en RT-qPCR, lo que impide sacar conclusiones claras sobre su expresión.

Por otra parte, en las muestras de gametofito auto fecundado, en el que el embrión del esporofito ha comenzado a desarrollarse, podemos observar expresión de los genes *CrRAV1-5* en el tejido del gametofito, pero no en el tejido del embrión en desarrollo (Figura 61), lo que podría estar indicando un papel de estos genes en el cambio de fase.

La presencia de salinidad en el medio provoca la alteración de la expresión de los genes RAV

Hemos observado que los genes *CrRAV* han mostrado tener la capacidad de regular la inducción floral al ser expresados en *Arabidopsis* y tener el potencial de ser reguladores de la transición reproductora en *Ceratopteris richardii*, de modo que decidimos comprobar si pudieran estar también relacionados con la respuesta a estrés abiótico.

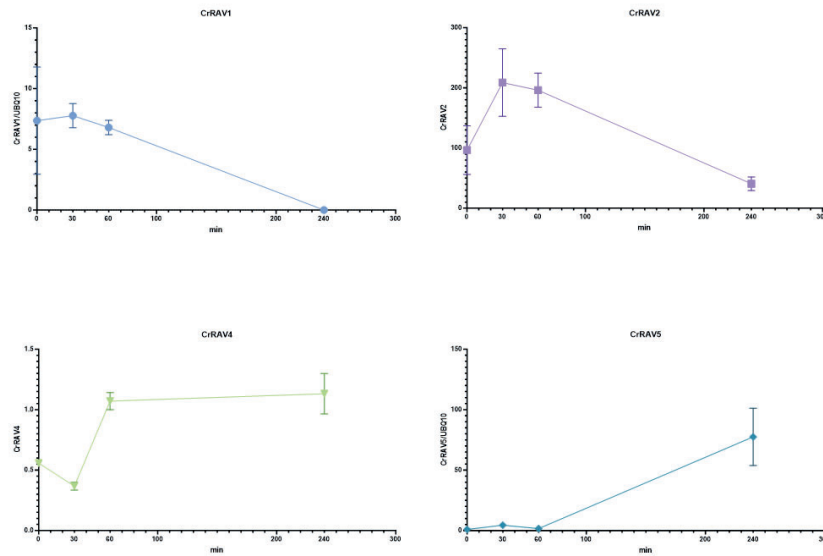


Figura 62. Expresión de *CrRAV* en gametofitos sometidos a tratamiento de salinidad

Al exponer los gametofitos a una concentración media de salinidad (150mM NaCl), pudimos observar tres tendencias diferentes. *CrRAV1* y *CrRAV2* disminuyeron su expresión, tras un pequeño pico a la media hora de ser expuestos a la salinidad. La expresión de *CrRAV4* se reduce a la media hora de la exposición al tratamiento, pero se recupera y aumenta tras una hora en tratamiento. Finalmente, la expresión de *CrRAV5* se dispara tras la hora de tratamiento de salinidad. No fue posible detectar expresión del gen *CrRAV3* en ningún punto del análisis (Figura 62).

Estos resultados indican que la expresión de los genes *CrRAV* se ven alterados por la presencia de salinidad y que la regulación es diferente en cada gen. Esto podría indicar un rol en la respuesta temprana y adaptativa a la salinidad por parte de los genes *RAV* en *Ceratopteris richardii*.

Discusión

TEM modula el desarrollo vegetativo y la inducción floral en respuesta a salinidad

Los *RAV* controlan el desarrollo además de la respuesta a sequía y salinidad en diferentes especies de plantas (Duan et al., 2016; Sohn et al., 2006; Zhao et al., 2017), convirtiéndolos en buenos candidatos para el estudio de la regulación del crecimiento adaptativo. Entre los genes *RAV* de *Arabidopsis*, *TEM1* y *TEM2* se expresan ampliamente en diferentes tejidos durante el ciclo de vida de la planta y juegan diversos roles en el crecimiento mediante la reducción del contenido de GA (Matías-Hernández et al., 2016; Osnato et al., 2012).

El estrés salino retrasa diferentes cambios de fase del desarrollo. En particular, la germinación de semillas (de embrión a vegetativo) y la transición floral (de vegetativo a reproductivo); dos procesos promovidos por la acción de GA. Precisamente, es la interacción entre GA y su fitohormona antagónica ABA la responsable de la regulación de la germinación de las semillas, asegurando el éxito en el establecimiento de la plántula. La biosíntesis de ABA aumenta durante el desarrollo del embrión para inducir la dormancia de la semilla y prevenir la germinación prematura en las silicuas. Asimismo, el ABA se acumula en respuesta a la sequía y la salinidad para evitar el desarrollo de plántulas bajo condiciones adversas (Shu et al., 2018). Al contrario, en condiciones favorables, el contenido de ABA disminuye rápidamente después de la imbibición de la semilla y la biosíntesis de GA aumenta para promover la ruptura de la testa, seguido de la protrusión la radícula del tegumento de la semilla (Shu et al., 2018). Igual que se observó en los mutantes *rav1* y *rav1-like* (Fu et al., 2014), los mutantes *tem* también mostraron una facilidad para la germinación en condiciones de estrés salino, sugiriendo que sus niveles aumentados de GA podrían compensar la inhibición inducida por la sal.

En fases más avanzadas, la salinidad del suelo retrasa el crecimiento de la planta, lo cual se refleja en una reducción en la acumulación de biomasa. También se ve inhibido el desarrollo de órganos verdes y provoca una curvatura en las hojas de plantas tanto WT como mutantes. Sin embargo, los mutantes *tem* muestran un aumento significativo, aunque moderado en peso fresco al compararlas con las plantas WT en condiciones de estrés salino leve.

La transición floral también se ve afectada por la presencia de sal de manera dosis-dependiente (Zhang et al., 2011), bien mediante la activación del represor floral *FLC* o a través de la represión del promotor floral *LFY* (K. Li et al., 2007). Cabe destacar que los mutantes *tem* mostraron una transición floral anticipada independientemente del tratamiento, indicando que los TEMs podrían integrar la transición floral y la sensibilidad a la sal a nivel molecular. De hecho, la inhibición de la expresión de *FT* y *TSF* debida a la sal en los mutantes *tem* no es suficiente para evitar inducción floral.

Por todo ello proponemos un rol para los TEMs en la integración del desarrollo de la planta y la respuesta al estrés salino regulando la acumulación de GAs y la activación de integradores florales. Hipotetizamos que un ciclo de vida más rápido (como consecuencia de una fase vegetativa acortada y floración temprana) permite a los mutantes *tem* superar la inhibición del crecimiento desencadenada por la sal. La restricción del crecimiento vegetativo asociada a la floración temprana también podría ser una ventaja bajo condiciones ambientales adversas. De hecho, las plantas adultas *tem* podrían ser menos vulnerables al estrés abiótico debido a la superficie reducida de sus rosetas. Al madurar, los mutantes *tem* son considerablemente más pequeños que las plantas de tipo salvaje justo porque el desarrollo vegetativo cesó en la transición floral, un proceso que en las plantas mutantes ocurre antes y conlleva a la formación de menos hojas al florecer.

Las plantas *TEMI*-SE son enanas, pero exhiben senescencia precoz e hipersensibilidad en respuesta a la salinidad. Esto podría sugerir que los TEM juegan roles adicionales en la reprogramación transcripcional que subyacen a las respuestas al estrés salino con independencia de otras rutas genéticas que regulan el tamaño de la planta.

Los *TEM* regulan la senescencia inducida por salinidad mediada por JA (ácido jasmónico).

La senescencia es un proceso fisiológico que conduce al amarilleamiento de las hojas y está regulada por el envejecimiento, pero también puede inducirse prematuramente en respuesta a estrés abiótico y biótico mediante el aumento de los niveles de fitohormonas endógenas como JA, ABA y etileno (He et al., 2002).

En nuestros estudios observamos que la progresión de la senescencia inducida por la sal se retrasa en las plantas *tem*, probablemente como resultado de la inhibición de los genes de biosíntesis de JA y, en consecuencia, de la reducción del contenido de esta hormona que promueve la senescencia. Como prueba de ello, los marcadores moleculares asociados a la senescencia, como *MKK9* y *SAG* seleccionados, se activaron tras el tratamiento con sal en las plantas silvestres, pero se redujeron en las plantas mutantes. De acuerdo con trabajos anteriores, *MKK9* se induce por JA y se transcribe en hojas senescentes tempranas, mientras que *SAG12* se expresa en hojas senescentes tardías (C. Zhou et al., 2009). De hecho, las plantas que sobre-expresan *MKK9* son hipersensibles a la sal y presentan senescencia precoz, mientras que los mutantes con pérdida de función *mkk9* son más tolerantes a la sal y presentan senescencia retardada (Xu et al., 2008; C. Zhou et al., 2009).

Además, *SAG113/HAI1* se induce en respuesta a la salinidad y la sequía (Bhaskara et al., 2012) y se inhibe en mutantes *tem*. Curiosamente, *SAG113/HAI1* regula negativamente (i) la expresión de genes que codifican deshidrinas y proteínas abundantes en embriogénesis tardía y (ii) la producción de osmolitos incluyendo prolina a bajo potencial hídrico (Bhaskara et al., 2012). Por lo tanto, proponemos que los TEMs juegan un papel regulador en la senescencia foliar mediante la modulación de la expresión de genes de biosíntesis de JA y reguladores del componente osmótico de la respuesta al estrés abiótico, probablemente de una manera independiente de ABA (Bhaskara et al., 2012; Nguyen & Cheong, 2018; Xu et al., 2008; C. Zhou et al., 2009).

Los *TEM* tienen una función en la respuesta al estrés oxidativo inducido por salinidad.

En la línea de los resultados moleculares, los estudios metabólicos corroboraron el retraso de la senescencia en las plantas mutantes sometidas a estrés salino. De hecho, el análisis de los marcadores fisiológicos asociados a la senescencia reveló que el contenido total de clorofilas y carotenoides disminuye en mayor medida en el tipo silvestre que en el mutante. Además de la degradación de estos pigmentos, el estrés oxidativo está directamente relacionado con la disminución de la capacidad fotosintética. Junto con la regulación de la homeostasis osmótica e iónica, otras estrategias para proteger a las plantas frente al estrés abiótico incluyen el aumento de la producción de metabolitos secundarios implicados en la protección de los PS frente a los niveles tóxicos de ROS. En concreto, la acumulación de moléculas con propiedades antioxidantes, como la vitamina E, previene la propagación de la peroxidación lipídica causada por el aumento de los niveles de ROS en condiciones de estrés. En concordancia, con estudios previos que demostraron que las plantas pobres en vitamina E son más sensibles al estrés oxidativo inducido por la sal (Ellouzi et al., 2013).

Para mitigar el daño fotooxidativo y evitar la sobreexcitación de los PS en condiciones de estrés, las plantas reducen la absorción de luz principalmente regulando la expresión de genes que codifican factores de unión de la clorofila a/b y de componentes de los complejos de captación de luz. Por ejemplo, *ELIP2* impide el estrés fotooxidativo inducido por condiciones externas adversas bloqueando la acumulación de clorofila libre. De este modo, *ELIP2* regula negativamente la síntesis de clorofila, ya que secuestra unidades disponibles para el ensamblaje de proteínas de unión a pigmentos para la fotosíntesis (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007).

En nuestros estudios, observamos una acumulación de a-tocoferol y un aumento de los niveles de *ELIP2* en las plantas *tem* en respuesta a la salinidad, lo que sugiere una reducción del estrés fotooxidativo en el mutante. En resumen, las plantas *tem* soportan mejor el estrés salino que las plantas silvestres debido a una menor acumulación de ROS, una degradación más lenta de los pigmentos y una mayor producción de moléculas con propiedades antioxidantes (a-tocoferol y *ELIP2*).

Dado que la fotosíntesis es la principal fuente de energía para el crecimiento de las plantas y es extremadamente sensible al estrés abiótico, una rápida adaptación de la planta al medio ambiente es esencial para hacer frente a las condiciones fluctuantes.

Los genes *RAV* han sido identificados previamente como TFs implicados en la regulación del crecimiento en respuesta a estrés abiótico, específicamente en la tolerancia a la presencia de salinidad de manera independiente a ABA (Fu et al., 2014).

TEM y MYC juegan papeles antagonistas en respuesta a la sequía

Las proteínas TEM y MYC regulan de manera aditiva la transición floral y su pérdida de función se correlaciona con una floración temprana severa, agravada aún más por una segunda mutación en *COP1*. Los resultados de análisis moleculares y fenotípicos de mutantes de orden superior sugirieron que los represores florales en estudio podrían prevenir la floración precoz en hojas juveniles bajo longitudes de día inductivas y no inductivas. De hecho, la pérdida de actividad represiva en plantas *myc cop1 tem* acelera la floración debido a la falta de represión de integradores florales (también relacionada con la degradación atenuada del activador floral CO), la sobreexpresión de activadores florales de la vía autónoma y la consecuente regulación negativa del represor floral FLC mediada por modificación de cromatina (por ejemplo, hipo-acetilación de histonas).

La activación transcripcional de *FT* ocurre cuando los represores florales no están activos (por ejemplo, después de la transición de juvenil a adulto o en mutantes con pérdida de función) y se activa por la formación de un lazo de cromatina de larga distancia que acerca elementos potenciadores distales unidos por el complejo NUCLEAR FACTOR Y (NF-Y) a elementos promotores proximales unidos por el activador floral CO (Cao et al., 2014). Por el contrario, la expresión de *FT* se inhibe cuando los represores florales están activos (por ejemplo, en condiciones no inductivas o plántulas WT en condiciones inductivas) e interfieren con la RNA polimerasa II cerca del TSS. Alternativamente, TEM1 podría interactuar con MYC2 y MYC3 (que se une a un elemento promotor ubicado a -3192 bp de ATG) para constituir un complejo regulador capaz de bloquear la formación del lazo de cromatina mediado por el complejo NFY-CO; este último mecanismo, también

llamado "antilooping", fue previamente descrito en la especie modelo *Drosophila melanogaster* (Chopra et al., 2012). Además del control de la iniciación de la transcripción, otros mecanismos podrían contribuir al mantenimiento de un estado transcripcionalmente represor de *FT*. Tal y como se reporta en (Hu et al., 2021), TEM1 interactúa con CLF y recluta al Complejo Represor de Polycomb 2 (PRC2) a la región de *FT* cerca del ATG, induciendo así la condensación local de la cromatina (a través de la retirada de marcas represivas H3K27me3) y reduciendo la accesibilidad a los factores de transcripción (TFs). TEM también podría reclutar co-represores TPL/TPR (Causier et al., 2012), los cuales inducen el silenciamiento génico de dianas *downstream* a través de la actividad de modeladores de cromatina (Long et al., 2006; Plant et al., 2021), especialmente las histona deacetilasas (Pauwels et al., 2010).

Además del control de la transición floral, las alteraciones en el desarrollo de flores y semillas observadas en los mutantes de orden superior sugieren que los factores MYC y TEM desempeñan funciones adicionales durante el crecimiento reproductivo.

Concretamente, los mutantes *myc cop1* muestran únicamente alteraciones leves en los órganos florales, pero los mutantes *myc cop1 tem* exhiben una producción de semillas deficiente probablemente debida a defectos en la polinización, como ya se observó en el mutante *myc2 myc3 myc4 myc5* (Qi et al., 2015). Las proteínas MYC regulan de manera redundante el desarrollo de los estambres interactuando con miembros de la familia MYB –a saber, MYB21, MYB24 y MYB57– (Qi et al., 2015). Dada la interacción entre TEM2 y MYB21 encontrada en nuestro cribado Y2H, una posibilidad interesante es que TEM2 pudiera ser un componente auxiliar del complejo MYB-MYC que conduce a la formación correcta de los órganos reproductivos masculinos, aunque serán necesarios análisis adicionales para dilucidar la función de TEM en estas estructuras. Por otro lado, los TEM podrían regular el desarrollo de los estambres controlando la expresión de los genes *LOX* que codifican enzimas involucradas en los primeros pasos de la biosíntesis de JA, crucial para la fertilidad masculina (Qi et al., 2015). Apoyando esta hipótesis, los mutantes *lox3 lox4* muestran defectos en la maduración y dehiscencia de las anteras que afectan la viabilidad del polen (Caldelari et al., 2011).

El JA también regula otros procesos de desarrollo, como la formación de estomas. Como los mutantes con niveles disminuidos de JA mostraron una mayor densidad de estomas, tanto las proteínas MYC como TEM podrían regular negativamente el desarrollo de los estomas al regular positivamente la biosíntesis de JA. Sin embargo, estos factores de transcripción modulan la expresión de distintos genes *diana*, sugiriendo una interacción compleja entre estos reguladores en el patrón de los estomas. De hecho, las proteínas TEM podrían controlar genes que codifican moléculas de señalización que regulan negativamente la iniciación del linaje celular estomático (Zoulas et al., 2018). En cambio, los MYCs reprimen *SPEECHLESS (SPCH)*, *MUTE* y *FAMA* (Han et al., 2018) - tres factores bHLH que regulan positivamente las transiciones de meristemoides a células guardia (Torii, 2021).

Nuestros estudios indicaron que MYC y TEM también regulan el tiempo de floración en respuesta al estrés ambiental que simula al cambio climático, como el aumento de las temperaturas ambientales y la disminución de la disponibilidad de agua. Por ejemplo, cuando las plantas fueron cultivadas a temperaturas ambientales elevadas, todos los genotipos mostraron termomorfogénesis durante la fase vegetativa (hipocótilo y pecíolos alargados, termonastia foliar) pero los mutantes sextuples mostraron insensibilidad a la inducción térmica de la floración. Estos hallazgos sugieren que los TEM contribuyen a la floración termo-responsiva en WT, junto con los MYC y COP1.

La floración anticipada también se observa en plantas sometidas a sequía (Riboni et al., 2013). Esto no necesariamente significa que un ciclo de vida más rápido confiera tolerancia al déficit hídrico, sino que una fase vegetativa acortada permite a las plantas alcanzar la madurez antes de que ocurra una sequía severa, incluso con una producción de semillas reducida. La llamada estrategia escape a la sequía (es decir, crecimiento acelerado sostenido por un aumento de la fotosíntesis y la fotorrespiración) ha sido descrita en plantas de *Arabidopsis* cercanas a la madurez que experimentan déficit de agua en LDs pero no en SDs, probablemente porque GI no está activo en fotoperíodos no inductivos. Sorprendentemente, los resultados de nuestro estudio insinúan que los mutantes sextuples podrían adoptar un escape a la sequía constitutivo independientemente

del fotoperíodo y la disponibilidad de agua. Como evidencia de apoyo, las plantas *myc cop1 tem* mostraron una floración extremadamente temprana y una alta tasa de transpiración también en condiciones controladas. Además, las alteraciones morfológicas de los estambres y los defectos de fertilidad de los mutantes sextuples se asemejan a los observados en plantas WT sometidas a privación de agua (Ma et al., 2014; Su et al., 2013).

Los resultados de nuestros estudios sugieren que los mutantes de floración temprana examinados aquí difieren en su sensibilidad a la limitación de agua probablemente debido a un patrón de estomas alterado que afecta la tasa de transpiración. En condiciones de déficit de agua bajo SDs, la actividad reducida de todos los represores florales podría causar un escape a la sequía constitutivo, lo cual podría ser una estrategia perjudicial bajo fotoperíodos no inductivos, mientras que la actividad reducida solo de los reguladores TEM parece ser beneficiosa, porque las alteraciones en las estructuras epidérmicas de la hoja (como tricomas y estomas) podrían prevenir la pérdida de agua. Precisamente, cambios en el patrón de estomas (incluido el fenotipo de célula guardia detenido) en la superficie abaxial y el aumento de la densidad de tricomas en la superficie adaxial (Matías-Hernández et al., 2016) pueden conferir una mayor tolerancia a la desecación.

Estudios anteriores y actuales señalan diferentes roles regulatorios de los represores florales TEM en la respuesta de las plantas a los estreses abióticos. Las mutaciones en los genes TEM no solo reducen la vida útil en condiciones adversas, sino que también confieren resistencia al déficit hídrico controlando la transpiración. Por lo tanto, modular la actividad de TEM en las hojas puede ser un enfoque prometedor para aumentar la resiliencia climática en las plantas: limitar los daños oxidativos causados por especies reactivas de oxígeno (ROS) y la deshidratación del tejido causada por la pérdida de agua representan estrategias poderosas para responder rápidamente a las limitaciones ambientales sin afectar la producción de semillas. Durante este trabajo hemos limitado nuestra investigación a estrés abióticos individuales o combinaciones simples de estrés, pero las investigaciones futuras deberían enfocarse en estrés multifactoriales que afectan severamente el crecimiento y la productividad de las plantas (Zandalinas & Mittler, 2022).

Los análisis exploratorios del linaje de las plantas revelaron la presencia de genes *RAV* en briofitas y licofitas, plantas terrestres que carecen de estructuras florales. Aunque se necesitan estudios más profundos, especulamos que, durante la evolución de las plantas, estos reguladores podrían haber jugado un papel en la terrestialización de las plantas (por ejemplo, adaptación a estrés ambientales como la privación de agua, temperaturas fluctuantes y salinidad del suelo) y luego adquirieron una función en el control de la floración cuando emergieron las angiospermas. Dado que la actividad de las proteínas *RAV* en la regulación del crecimiento reproductivo parece conservarse en cultivos modernos, incluyendo la soja (Lu et al., 2014), el arroz (Osnato et al., 2020), el níspero (Peng et al., 2021) y el trigo (VanGessel et al., 2022), su manipulación mediante edición genómica o la selección de variantes genéticas favorables podrían ser explotadas para obtener nuevas variedades capaces de adaptar su desarrollo a una amplia gama de limitaciones ambientales y mantener la fertilidad en un clima cambiante.

Los *RAVs* de plantas basales son capaces de regular la inducción floral

Tanto en trabajos anteriores como en el desarrollo de este trabajo se ha establecido a los genes *RAV* como moduladores de peso en el desarrollo de las plantas en respuesta a señales ambientales (Mittal et al., 2014; S. Wang et al., 2021).

La expresión de los genes *RAV* del helecho *Ceratopteris richardii* en *Arabidopsis* provoca un retraso de la floración similar, aunque de menor nivel que el obtenido por la sobreexpresión de *TEMI* de *Arabidopsis*. Por su parte, la expresión en *Arabidopsis* de los *RAVs* de *Selaginella moellendorffii* tiene un efecto dual. Por un lado, la expresión de *SmRAV2* secunda los resultados observados para los *RAVs* de *Ceratopteris richardii*, retrasando la floración, mientras que la expresión de *SmRAV1* ejerce un papel inductor de la floración. Estos resultados sugerirían que la capacidad de los genes *RAV* como reguladores de la floración se encuentra conservada a lo largo de la evolución vegetal y que su operatividad sería dependiente del contexto genético.

En este sentido, la capacidad de interacción tanto con activadores como con represores de la inducción floral podría resultar determinante. En los ensayos de interacción proteína-proteína, SmRAV1 mostró capacidad para interaccionar tanto con GI, como SVP y TPL (activador y represores de la floración respectivamente), mientras que SmRAV2 únicamente mostró interacción con GI y TPL. Cabe destacar que pequeñas modificaciones de la secuencia pueden tener un gran impacto en la función de los genes reguladores de la inducción floral; es sabido que la modificación de un único residuo es suficiente para invertir la función de *TPL* de represor a promotor de la inducción floral (Hanzawa et al., 2005).

En *Ceratopteris richardii*, la expresión diferencial de los genes *RAV* durante la transición de gametofito a esporofito y en hojas fértiles (específicamente en esporangios) sugiere un papel en la diferenciación de tejidos y en la transición a la fase reproductora. El desarrollo sexual de los gametofitos de *Ceratopteris richardii* se encuentra regulado por una fitohormona llamada anteriodiógeno, cuya presencia en el medio determina el desarrollo de los gametofitos como machos (Banks, 1999). Esta fitohormona es un derivado del ácido giberélico (Atallah & Banks, 2015), cuya síntesis se encuentra regulada por la expresión de los genes *RAV* en *Arabidopsis* (Osnato et al., 2012), abriendo la puerta a una posible implicación de los *CrRAV* en la determinación del sexo en los gametofitos de *Ceratopteris richardii*.

Conclusiones

1. Los genes *TEM* desempeñan un rol importante en la respuesta a estrés salino y su inhibición es suficiente para eludir los efectos que la salinidad ejerce sobre el crecimiento y la transición floral en *Arabidopsis*.
2. Los genes *MYC* y *TEM* también regulan el tiempo de floración en respuesta al estrés ambiental, como la temperatura ambiental elevada y la escasez de agua.
3. Los mutantes *tem* se muestran insensibles a la salinidad, sequía y altas temperaturas.
4. La ausencia de *TEM* en combinación con la ausencia de *SVP* es suficiente para recuperar un fenotipo de floración WT en mutantes *GI* y recuperar la respuesta de escape a sequía. *GI* ejerce su función de regulación de la floración a través de *TEM* y *SVP*, vía interacciones proteicas que evitarían la función de los represores florales.
5. En ausencia de *SVP* y *GI* los mutantes *tem* pierden su tolerancia a salinidad.
6. Los genes *RAV* de plantas basales como como licofitos y helechos tienen la capacidad de regular de la inducción floral en *Arabidopsis*.
 - a. El gen *SmRAV1* promueve la inducción floral en *Arabidopsis*, mientras que la expresión de *SmRAV2* la retrasa.
 - b. Los genes *CrRAV* actúan de manera consistente como represores de la inducción floral en *Arabidopsis*.
7. Los genes *CrRAV* presentan una expresión temporal y espacial diferencial en *Ceratopteris richardii*, que podría responder a la regulación de la transición reproductora y a la formación de estructuras sexuales.

Materiales y métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col-0, *tem1-1tem2-2*, *myc2myc3myc4* y *tem1-1tem2-2myc2myc3myc4*, *gi-1*, *syp-31*, *gi-1tem1-1tem2-2*, *gi-1syp-31*, *tem1-1tem2-2syp-31*, *gi-1tem1-1tem2-2syp-31*, *35S:SmRAV1*, *35S:SmRAV2*, *35S:CrRAV3*, *35S:CrRAV4* y *35SCrRAV5*) fueron cultivadas en tiestos en cámaras de crecimiento bajo condiciones de fotoperíodo de día largo (LD 16h luz, 8h oscuridad) y condiciones de fotoperíodo de día corto (SD 8h luz, 16h oscuridad). La mezcla de suelo utilizada fue de 2:1:1 turba:perlita:vermiculita y las intensidades de luz en la cámara fueron de 230 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Las semillas fueron esparcidas sobre el sustrato, estratificadas a 4°C durante 2 días y luego fueron trasladadas a la cámara de crecimiento a 22°C (temperatura óptima de crecimiento) o 27°C (temperatura ambiente elevada).

Las esporas de *Ceratopteris richardii* (línea silvestre, RN3) fueron esterilizadas en hipoclorito de sodio 4% durante 5 minutos, lavadas de 4 a 5 veces con agua esterilizada y incubadas en oscuridad de 3 a 5 días a temperatura ambiental para sincronizar la germinación. Después se trasladaron a una cámara a 26°C con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8h con la misma intensidad lumínica que para el resto de cultivos y una agitación de 150rpm/min.

Para el tratamiento de limitación de agua, las semillas de WT y mutantes se germinaron en suelo durante tres días y las plántulas se dividieron en tres grupos: bien regadas (1 volumen de agua por volumen de suelo, 20 ml), 50% de agua (1/2 volumen de agua por volumen de suelo, 10 ml) y 25% de agua (1/4 volumen de agua por volumen de suelo, 5 ml). Las plantas se cultivaron en macetas individuales (40 gr de suelo) y se regaron dos veces a la semana hasta la madurez. Para el tratamiento de desecación, plantas de 3 semanas de edad cultivadas en SDs fueron sometidas a la retención de agua durante 7 días; la tasa de supervivencia se calculó como el porcentaje de plantas verdes después de 3 días de re-riego.

En los tratamientos de salinidad, el grupo de control fue regado con agua, mientras que los grupos de estrés salino leve y alto fueron regados con agua que contenía 50 mM de NaCl (baja concentración) y 100 mM de NaCl (concentración media) respectivamente, para simular un aumento natural de la salinidad.

Clonación y obtención de constructos

Para la obtención del constructo p35S:SmRAV2, se amplificó el gen por PCR a partir de DNA genómico con los óligos descritos en la Figura 64. El amplicón resultante fue clonado en el vector *pGEM-T-easy* mediante restricción, tras lo cual fue insertado en el vector *pAlligator2* mediante reacción LR (Gateway® Cloning).

El constructo p35S:SmRAV1 se obtuvo mediante la reacción LR de *pAlligator2* con el constructo pTWIST ENTR, sintetizado por la compañía Twist Biosciences.

Cruzamientos

Las plantas *tem1-ltem2-2*, *myc2myc3myc4* y *tem1-ltem2-2, myc2myc3myc4* habían sido generadas previo a mi llegada al laboratorio.

Las plantas *gi-ltem1-ltem2-2*, *gi-lsvp-3l*, *tem1-ltem2-2svp-3l* y *gi-ltem1-ltem2-2svp-3l* fueron generadas por cruzamiento para la obtención de líneas heterocigotas. Las plantas fueron genotipadas en cada generación en busca de plantas homocigotas con los plásmidos descritos en la Figura 64

Aislamiento de plásmidos

La extracción y aislamiento de plásmidos se realizó mediante el *Macherey-Nagel Nucleospin Plasmid Kit* (Cultek S.L.U.). Se aplicó el protocolo comercial a partir de 4mL de cultivo líquido. La concentración obtenida fue estimada mediante Nanodrop y se analizó la integridad de los plásmidos mediante restricción enzimática. Todos los plásmidos fueron comprobados mediante secuenciación.

Transformación de las bacterias

Se utilizó 1µL de plásmido para transformar *Escherichia coli* TOP10 competentes o *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 o EHA105 mediante *heat shock* (1 min a 42°C). Las células transformadas crecieron en 500µL de medio LB o YEB sin antibióticos durante 1h, tras la cual fueron precipitadas, resuspendidas en 100µL y sembradas en medio sólido con antibióticos específicos para la selección de colonias independientes.

Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Se utilizaron cultivos líquidos de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformados con el plásmido de interés mediante la técnica de *floral dip* de acuerdo al protocolo descrito por Clough & Bent, 1998. Las plantas se mantuvieron en oscuridad durante 12 h para facilitar la infección y posteriormente fueron trasladadas a los invernaderos.

Selección de las líneas transgénicas

Las semillas transgénicas de primera generación (T₁) fueron seleccionadas visualmente mediante el uso de estereomicroscopio usando GFP como marcador. En torno a 20 semillas T₁ fueron sembradas y llevadas a T₂. La segregación de estas líneas T₂ fue nuevamente analizada en busca de aquellas con una única inserción, es decir, aquellas con una ratio 3:1 fluorescencia: no fluorescencia. Las líneas T₂ seleccionadas fueron sembradas y las semillas T₃ fueron analizadas en busca de aquellas con un 100% de fluorescencia. Éstas fueron identificadas como homocigotas y seleccionadas como las líneas de trabajo.

Estudio del tiempo de floración

Para determinar el fenotipo de tiempo de floración se tomaron medidas del número de días desde la germinación hasta la detección visual del botón floral y hojas de roseta, caulinares y totales en el momento en el que el tallo alcanza en torno a 1 cm de longitud. Se recolectaron los datos de en torno a 15 plantas para el estudio de cada línea o cruce.

Los tiempos de floración se analizaron mediante ANOVA, los test Post-hoc se hicieron utilizando el teste de Tukey para múltiples comparaciones [referencia] tas ANOVAs Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión 10.1 de PRISM (GraphPad Software, Inc.).

Análisis de la densidad y morfología de los estomas

Utilizando Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se analizó el lado abaxial de las hojas disecadas de los cuatro genotipos cultivados bajo días cortos (SD) durante tres semanas con limitación creciente de agua.

Se llevaron a cabo experimentos de pelado en hojas completamente expandidas (disecadas de plantas cultivadas durante tres semanas bajo SDs) como se describió anteriormente (Morillon y Chrispeels, 2001). Para cada genotipo, se cortaron tres hojas (una hoja equivalente por planta) y las superficies inferiores se adhirieron a un portaobjetos de microspora con un adhesivo médico (Hollister, Libertyville, IL, EE.UU.). Después de 1 a 2 minutos, la hoja se utilizó agua destilada para despegar la hoja. Las epidermis abaxiales se visualizaron bajo el microscopio Zeiss LSM710 (Carl Zeiss, Inc.). El recuento del número de estomas se realizó utilizando el software de imagen Image J, versión 6.

La densidad de estomas (número de estomas por unidad de área) se calculó contando el número de estomas en cinco áreas cuadradas de 0.5 mm^2 para cada hoja (promedio de dos réplicas). Los estomas fueron coloreados en verde pálido para facilitar su identificación.

ChIP

Las muestras fueron fijadas en un tampón de entrecruzamiento (0,4 M de sacarosa, 10 mM de Tris·HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 1% de formaldehído, 1 mM de PMSF, 1 mg/mL de pepstatina A, 1 mg/mL de aprotinina) mediante infiltración al vacío durante 10-15 minutos. La fijación se detuvo añadiendo glicina hasta una concentración final de 100 mM e incubando durante 5 minutos. Los tejidos fijados se lavaron con agua, se secaron con papel estéril y se congelaron en nitrógeno líquido.

El ADN entrecruzado fue inmunoprecipitado con un anticuerpo anti-HA (Sigma). El ADN inmunoprecipitado se purificó con resina de proteína A-agarosa (Millipore) y se analizó mediante qPCR utilizando el sistema Light Cyclers 480 II con una *MasterMix* de SYBR Green I (Roche).

El enriquecimiento relativo se calculó como el porcentaje del *input* y el *fold change* como una relación entre los valores obtenidos con/sin anticuerpo HA.

Los oligos utilizados pueden consultarse en la Figura 64

Western blot

Aislamiento de proteínas

Se recolectaron aproximadamente 1 cm² de muestra de hojas de aproximadamente 1 cm² de plantas de 2 semanas de edad. Esta muestra se congeló en nitrógeno líquido y se trituró utilizando un TissueLyserII (QIAGEN) a 30Hz durante 1 minuto. Las muestras se suspendieron en 200 ml de tampón de extracción (EB) y se centrifugaron a 10000g durante 10 minutos a 4°C para sedimentar el tejido no triturado. 100 ml del sobrenadante fueron transferidos a un tubo nuevo y se repitió la centrifugación. Se añadió un tinte de carga (concentración final 1X) a 50 ml del sobrenadante, se calentó a 95°C durante 5 minutos y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min.

Separación de proteínas

Los extractos de proteína fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida/bisacrilamida con SDS (SDS-PAGE). La concentración de los geles se estableció de acuerdo con los pesos moleculares esperados para las proteínas de interés. Para realizar la separación se cargaron 15 mL de cada muestra a analizar junto a un marcador guía. Los geles se dejaron correr a un voltaje constante de 175 V durante aproximadamente 1 h, hasta que el frente de carga había salido del gel.

Transferencia de proteínas, bloqueo y lavados de membrana

Tras la separación de las proteínas se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Whatman PORTRAN) utilizando un Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad) durante 40 min a 25 V y 1 A. Las membranas fueron posteriormente bloqueadas usando leche desnatada al 5% en TTBS durante 1 h a TA en agitación suave. Tras esto, la solución de bloqueo es descartada y las membranas son incubadas ON a 4°C en una solución de leche desnatada al 5% en TTBS con el anticuerpo Anti-HA-Peroxidasa diluido 1:5000 (Roche). Posteriormente la membrana es lavada de 3 a 6 veces en una solución TTBS 1x durante 10 min en agitación suave.

Detección de proteínas e revelado de imagen

La detección de las proteínas es realizada mediante quimioluminiscencia. El tratamiento de luminol (Amersham ECLTM PrimeWestern Blotting Detection Reagent) es aplicado durante 5 minutos y revelado en una ImageQuant 800 (Amersham Biosciencie). La detección del control de carga es realizada mediante la tinción con una solución de Ponceau al 0.5% y ácido acético al 1%.

Interacciones Proteína-proteína

Para los ensayos de BiFC, las secuencias de codificación de los genes de interés se transfirieron a los vectores pYFP^N43 y pYFP^C43 mediante recombinación Gateway para generar proteínas de fusión con los fragmentos N-terminal y C-terminal de YFP,

respectivamente. Los vectores obtenidos se utilizaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens* y se mezclaron diferentes colonias para producir las combinaciones deseadas. Las superficies abaxiales de las hojas de *Nicotiana benthamiana* se infiltraron con cepas que portaban los vectores YFP divididos junto con un plásmido que alberga la proteína p19 para suprimir el silenciamiento génico, siguiendo un protocolo previamente descrito por Schweiger & Schwenkert, 2014. Se utilizó el microscopio confocal para analizar las células epidérmicas de las hojas 3 días después de la inoculación.

Análisis de Expresión

El ARN se extrajo utilizando el kit de ARN de planta Maxwell RSC (Promega), se trató con DNasa I en columna y se utilizó para la síntesis de cADN de primera cadena mediante la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). Se utilizaron el Light Cycler 480 II con mezcla maestra de SYBR Green I (Roche) para la PCR cuantitativa en tiempo real (tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una). Los valores de ΔCt se calcularon restando los valores de Ct del gen diana del valor de Ct del gen eIF4 expresado de manera constitutiva, y los niveles de expresión relativos se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

Los oligos utilizados para el análisis de expresión se detallan en la Figura 64.

Hibridaciones *in situ*

Obtención de las sondas y preparación de las muestras

Para la generación de las sondas se amplificó una secuencia de 350bp para cada gen utilizando los oligos descritos en la Figura 64. Se usaron 2 μ g de amplicón para sintetizar la sonda antisentido como se describió anteriormente (Langdale 1993). Las sondas antisentido se marcaron con el kit de marcado de RNA DIG de Boehringer Mannheim, y se resuspendieron en un tampón de hibridación como se describe en (Torres et al. 1995).

Los gametofitos en transición a esporofitos y las muestras de hoja fértil se embebieron en paraformaldehído al 4% en PBS 1 $\times$ a 4°C durante 36 horas. Luego, las muestras fueron

deshidratadas a 4°C a través de una serie graduada de etanol (EtOH) conteniendo 130 mM de NaCl. El tejido fue colocado después en 25:75; 100% EtOH:*Histoclear* (National Diagnostics), 50:50; EtOH:*Histoclear*, 25:75; EtOH:*Histoclear*, y 3 veces en 100% *Histoclear* a temperatura ambiente durante 1.5 horas cada uno. El *Histoclear* fue reemplazado gradualmente con *paraplast* fundido, y el tejido fue vertido en moldes y seccionado en un micrótopo a un grosor de 8µm.

Hibridación

Para la hibridación de las muestras primero se eliminó el *paraplast* mediante dos lavados de *Histoclear* de 10 min cada uno. Seguidamente se rehidrató el tejido con una serie de lavados en concentraciones decrecientes de alcohol:mQH₂O de 2 minutos cada uno. El tejido fue acidificado en 0.2M HCl y posteriormente lavado una vez en mQH₂O y, 2xSSC y mQH₂O durante 5 minutos cada uno. Se aplicó un tratamiento con proteínasa K durante 30 minutos a 37°C para permitir la entrada de las sondas, tras lo cual se aplicó un lavado de 1xPBS y se bloqueó la reacción con un baño de glicina durante 2 minutos.

El tejido fue nuevamente fijado en 3,7% formaldehído y puesto a hibridar con 250µL de sonda durante la noche en una caja humidificada al 50% de formamida a 55°C.

Detección de la señal

Tras la hibridación las muestras fueron lavadas en baños sucesivos de 2xSSC, 50% formamida y 1xTBS durante 2h a 55°C cada uno. Las muestras fueron bloqueadas con 0.5% *blocking buffer* (Roche) durante 1h a temperatura ambiente y posteriormente lavadas en 1% BSA durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual la muestras fueron incubadas con el anticuerpo durante 2h a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas nuevamente en 1%BSA y sumergidas en tampón de detección durante 5 minutos tras lo cual comienza la reacción de detección NBT/BCIP durante la noche.

Las muestras fueron lavadas en mQH₂O durante 5 minutos para detener la reacción de detección, deshidratadas con una serie de lavados de alcohol:mQH₂O de concentración creciente durante 5 minutos y finalmente lavadas en *Histoclear* durante 5 minutos.

Las muestras fueron selladas con *permount* antes de ser fotografiadas.

Tinción DAB

La acumulación de H_2O_2 fue detectada mediante la tinción con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) tal y como se describe en (Daudi & O'Brien, 2012).

Análisis de pigmentos fotosintéticos y anti-oxidantes

Las hojas de la roseta se obtuvieron de plantas de 4 semanas de edad, fueron trituradas en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Los metabolitos secundarios se extrajeron y analizaron mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, tecnología Agilent) como se describió anteriormente (Rodriguez-Concepcion, 2004), utilizando el carotenoide no vegetal cantaxantina como estándar interno.

Análisis de la fluorescencia de la clorofila

La fluorescencia de la clorofila en plantas de *Arabidopsis* de 5 semanas de edad se midió con la versión MAXI del fluorómetro IMAGING-PAM M-Series siguiendo las indicaciones el fabricante (Walz). Tras 30 minutos de adaptación a la oscuridad, se monitorizó la cinética de la fluorescencia de la clorofila en rosetas completas midiendo F_0 en la oscuridad y F_m con pulso de Saturación inicial, F_m' y F' durante una serie de pulsos SAT de Luz Actínica cada 60 segundos por 10 minutos, seguido por 30 minutos de relajación en oscuridad. Se calcularon los valores de Extinción No Fotoquímica (NPQ) para cada genotipo y condición. Estos valores indican el rendimiento del PSII de las plantas en respuesta al estrés salino.

Bibliografia

Adamczyk, B. J., Lehti-Shiu, M. D., & Fernandez, D. E. (2007). The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 50(6), 1007-1019. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03105.x>

Adrian, J., Torti, S., & Turck, F. (2009). From Decision to Commitment: The Molecular Memory of Flowering. *Molecular Plant*, 2(4), 628-642. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp031>

Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, 61(6), 1001-1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x>

Ambrose, B. A. (2013). The Morphology and Development of Lycophytes. En *Annual Plant Reviews Volume 45* (pp. 91-114). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118305881.ch3>

An Insight into Aging, Senescence, and Their Impacts on Wound Healing. (2021). *Advances in Geriatric Medicine and Research*. <https://doi.org/10.20900/agmr20210017>

Andrés, F., & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 627-639. <https://doi.org/10.1038/nrg3291>

Andrés, F., Porri, A., Torti, S., Mateos, J., Romera-Branchat, M., García-Martínez, J. L., Fornara, F., Gregis, V., Kater, M. M., & Coupland, G. (2014). SHORT VEGETATIVE PHASE reduces gibberellin biosynthesis at the *Arabidopsis* shoot apex to regulate the floral transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26). <https://doi.org/10.1073/pnas.1409567111>

Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796-815. <https://doi.org/10.1038/35048692>

Aragón-Raygoza, A., Herrera-Estrella, L., & Cruz-Ramírez, A. (2022). Transcriptional analysis of *Ceratopteris richardii* young sporophyte reveals conservation of stem cell factors in the root apical meristem. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.924660>

Atallah, N. M., & Banks, J. A. (2015). Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00100>

Atallah, N. M., Vitek, O., Gaiti, F., Tanurdzic, M., & Banks, J. A. (2018). Sex Determination in *Ceratopteris richardii* Is Accompanied by Transcriptome Changes That Drive Epigenetic Reprogramming of the Young Gametophyte. *G3 (Bethesda, Md.)*, 8(7), 2205-2214. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200292>

Ausín, I., Alonso-Blanco, C., Jarillo, J. A., Ruiz-García, L., & Martínez-Zapater, J. M. (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. *Nature Genetics*, 36(2), 162-166. <https://doi.org/10.1038/ng1295>

Baier, M., Kandlbinder, A., Golldack, D., & Dietz, K. (2005). Oxidative stress and ozone: Perception, signalling and response. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1012-1020. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01326.x>

Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., & Weigel, D. (2006). Potent Induction of *Arabidopsis thaliana* Flowering by Elevated Growth Temperature. *PLoS Genetics*, 2(7), e106. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020106>

Balasubramanian, S., & Weigel, D. (2006). Temperature Induced Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 1(5), 227-228. <https://doi.org/10.4161/psb.1.5.3452>

Banks, J. A. (1994). Sex-determining genes in the homosporous fern *Ceratopteris*. *Development (Cambridge, England)*, 120(7), 1949-1958. <https://doi.org/10.1242/dev.120.7.1949>

Banks, J. A. (1997). The Transformer Genes of the Fern *Ceratopteris* Simultaneously Promote Meristem and Archegonia Development and Repress Antheridia Development in the Developing Gametophyte. *Genetics*, 147(4), 1885-1897.

Banks, J. A. (1999). GAMETOPHYTE DEVELOPMENT IN FERNS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 163-186. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.163>

Banks, J. A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J. L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V. A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B. A., Ashton, N. W., Axtell, M. J., Barker, E., Barker, M. S., Bennetzen, J. L., Bonawitz, N. D., Chapple, C., Cheng, C., Correa, L. G. G., ... Grigoriev, I. V. (2011). The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6032), 960-963. <https://doi.org/10.1126/science.1203810>

Bao, S., Hua, C., Huang, G., Cheng, P., Gong, X., Shen, L., & Yu, H. (2019). Molecular Basis of Natural Variation in Photoperiodic Flowering Responses. *Developmental Cell*, 50(1), 90-101.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.018>

Becker, A. (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 464-489. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00207-0)

Berger, D., & Altmann, T. (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 14(9), 1119-1131. <https://doi.org/10.1101/gad.14.9.1119>

Bhaskara, G. B., Nguyen, T. T., & Verslues, P. E. (2012). Unique Drought Resistance Functions of the *Highly ABA-Induced* Clade A Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiology*, 160(1), 379-395. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202408>

- Blázquez, M. A., Ahn, J. H., & Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 33(2), 168-171. <https://doi.org/10.1038/ng1085>
- Blázquez, M. A., & Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*, 404(6780), 889-892. <https://doi.org/10.1038/35009125>
- Bui, L. T., Cordle, A. R., Irish, E. E., & Cheng, C.-L. (2015). Transient and stable transformation of *Ceratopteris richardii* gametophytes. *BMC Research Notes*, 8(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1193-x>
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E. E., & Dong, X. (2011). *Arabidopsis* *lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Molecular Biology*, 75(1-2), 25-33. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9701-9>
- Cao, S., Kumimoto, R. W., Gnesutta, N., Calogero, A. M., Mantovani, R., & Holt, B. F. (2014). A Distal *CCAAT* /NUCLEAR FACTOR Y Complex Promotes Chromatin Looping at the *FLOWERING LOCUS T* Promoter and Regulates the Timing of Flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(3), 1009-1017. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120352>
- Carey, R. E., Hepler, N. K., & Cosgrove, D. J. (2013). *Selaginella moellendorffii* has a reduced and highly conserved expansin superfamily with genes more closely related to angiosperms than to bryophytes. *BMC Plant Biology*, 13(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-4>
- Carroll, E. W., Schwarz, O. J., & Hickok, L. G. (1988). Biochemical Studies of Paraquat-Tolerant Mutants of the Fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiology*, 87(3), 651-654. <https://doi.org/10.1104/pp.87.3.651>
- Castillejo, C., & Pelaz, S. (2008). The Balance between CONSTANS and TEMPRANILLO Activities Determines FT Expression to Trigger Flowering. *Current Biology*, 18(17), 1338-1343. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.075>

Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., & Davies, B. (2012). The TOPLESS interactome: A framework for gene repression in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(1), 423-438. <https://doi.org/10.1104/pp.111.186999>

Chailakhyan, M. Kh. (1936). *New facts for hormonal theory of plant development*. 3, 443-447.

Chopra, V. S., Kong, N., & Levine, M. (2012). Transcriptional repression via antilooping in the *Drosophila* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9460-9464. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102625108>

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*: Floral dip transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>

Cooke, T. J., Hickok, L. G., & Sugai, M. (1995). The Fern *Ceratopteris richardii* as a Lower Plant Model System for Studying the Genetic Regulation of Plant Photomorphogenesis. *International Journal of Plant Sciences*, 156(3), 367-373.

Cooke, T. J., Hickok, L. G., Vanderwoude, W. J., Banks, J. A., & Scott, R. J. (1993). PHOTOBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A SPORE GERMINATION MUTANT *dkgl* WITH REVERSED PHOTOREGULATION IN THE FERN *Ceratopteris richardii*. *Photochemistry and Photobiology*, 57(s1), 1032-1041. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1993.tb02967.x>

Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S., & Watts-Tobin, R. J. (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 192, 1227-1232. <https://doi.org/10.1038/1921227a0>

Daudi, A., & O'Brien, J. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *BIO-PROTOCOL*, 2(18). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.263>

Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I. (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6), 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.001>

Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., & Yanofsky, M. F. (2004). The SEP4 Gene of *Arabidopsis thaliana* Functions in Floral Organ and Meristem Identity. *Current Biology*, 14(21), 1935-1940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.028>

Dorca-Fornell, C., Gregis, V., Grandi, V., Coupland, G., Colombo, L., & Kater, M. M. (2011). The *Arabidopsis* *SOC1* -like genes *AGL42* , *AGL71* and *AGL72* promote flowering in the shoot apical and axillary meristems. *The Plant Journal*, 67(6), 1006-1017. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04653.x>

Duan, Y.-B., Li, J., Qin, R.-Y., Xu, R.-F., Li, H., Yang, Y.-C., Ma, H., Li, L., Wei, P.-C., & Yang, J.-B. (2016). Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice *OsRAV2* through ex situ and in situ promoter analysis. *Plant Molecular Biology*, 90(1-2), 49-62. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0393-z>

Duckett, J. G., Klekowski, E. J., & Hickok, L. G. (1979). Ultrastructural studies of mutant spermatozoids in ferns. I. The mature nonmotile spermatozoid of mutation 230X in *Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn. *Gamete Research*, 2(4), 317-343. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120020406>

Ellouzi, H., Hamed, K. B., Cela, J., Müller, M., Abdelly, C., & Munné-Bosch, S. (2013). Increased sensitivity to salt stress in tocopherol-deficient *Arabidopsis* mutants growing in a hydroponic system. *Plant Signaling & Behavior*, 8(2), e23136. <https://doi.org/10.4161/psb.23136>

Fernandez, D. E., Wang, C.-T., Zheng, Y., Adamczyk, B. J., Singhal, R., Hall, P. K., & Perry, S. E. (2014). The MADS-Domain Factors AGAMOUS-LIKE15 and AGAMOUS-LIKE18, along with SHORT VEGETATIVE PHASE and AGAMOUS-LIKE24, Are

Necessary to Block Floral Gene Expression during the Vegetative Phase. *Plant Physiology*, 165(4), 1591-1603. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242990>

Ferrari, C., Shivhare, D., Hansen, B. O., Pasha, A., Esteban, E., Provart, N. J., Kragler, F., Fernie, A., Tohge, T., & Mutwil, M. (2020). Expression Atlas of *Selaginella moellendorffii* Provides Insights into the Evolution of Vasculature, Secondary Metabolism, and Roots. *The Plant Cell*, 32(4), 853-870. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00780>

Fornara, F., De Montaigu, A., & Coupland, G. (2010). SnapShot: Control of Flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 141(3), 550-550.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.024>

Fu, M., Kang, H. K., Son, S.-H., Kim, S.-K., & Nam, K. H. (2014). A Subset of *Arabidopsis* RAV Transcription Factors Modulates Drought and Salt Stress Responses Independent of ABA. *Plant and Cell Physiology*, 55(11), 1892-1904. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu118>

Gao, C., Qi, S., Liu, K., Li, D., Jin, C., Li, Z., Huang, G., Hai, J., Zhang, M., & Chen, M. (2016). MYC2, MYC3, and MYC4 function redundantly in seed storage protein accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.004>

Gao, Y., Yang, J., Duan, W., Ma, X., Qu, L., Xu, Z., Yang, Y., & Xu, J. (2022). NtRAV4 negatively regulates drought tolerance in *Nicotiana tabacum* by enhancing antioxidant capacity and defence system. *Plant Cell Reports*, 41(8), 1775-1788. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02896-5>

Garner, W. W., & Allard, H. A. (1922). Photoperiodism, the Response of the Plant to Relative Length of Day and Night. *Science*, 55(1431), 582-583. <https://doi.org/10.1126/science.55.1431.582>

- Gaston, K., & Jayaraman, P.-S. (2003). Transcriptional repression in eukaryotes: Repressors and repression mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(4), 721-741. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-2260-3>
- Han, X., Hu, Y., Zhang, G., Jiang, Y., Chen, X., & Yu, D. (2018). Jasmonate Negatively Regulates Stomatal Development in Arabidopsis Cotyledons. *Plant Physiology*, 176(4), 2871-2885. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00444>
- Hanzawa, Y., Money, T., & Bradley, D. (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7748-7753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500932102>
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettekheim, K., Wisman, E., Saedler, H., & Huijser, P. (2000). Molecular cloning of SVP: A negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 21(4), 351-360. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00682.x>
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D. F., & Gan, S. (2002). Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in Arabidopsis Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 128(3), 876-884. <https://doi.org/10.1104/pp.010843>
- He, Y., Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (2003). Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in Arabidopsis. *Science*, 302(5651), 1751-1754. <https://doi.org/10.1126/science.1091109>
- Hedden, P., & Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 5(12), 523-530. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01790-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01790-8)
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., James Peacock, W., & Dennis, E. S. (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal*, 46(2), 183-192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02686.x>

Herendeen, P. S., Friis, E. M., Pedersen, K. R., & Crane, P. R. (2017). Palaeobotanical redux: Revisiting the age of the angiosperms. *Nature Plants*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.15>

Hickok, L. G., & Schwarz, O. J. (1986). An in vitro whole plant selection system: Paraquat tolerant mutants in the fern *Ceratopteris*. *Theoretical and Applied Genetics*, 72(3), 302-306. <https://doi.org/10.1007/BF00288565>

Hickok, L. G., & Schwarz, O. J. (1989). Genetic characterization of a mutation that enhances paraquat tolerance in the fern *Ceratopteris richardii*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 77(2), 200-204. <https://doi.org/10.1007/BF00266187>

Hickok, L. G., Vogelien, D. L., & Warne, T. R. (1991). Selection of a mutation conferring high NaCl tolerance to gametophytes of *Ceratopteris*. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 81(3), 293-300. <https://doi.org/10.1007/BF00228666>

Hu, H., Tian, S., Xie, G., Liu, R., Wang, N., Li, S., He, Y., & Du, J. (2021). TEM1 combinatorially binds to *FLOWERING LOCUS T* and recruits a Polycomb factor to repress the floral transition in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(35), e2103895118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2103895118>

Hwang, K., Susila, H., Nasim, Z., Jung, J.-Y., & Ahn, J. H. (2019). Arabidopsis ABF3 and ABF4 Transcription Factors Act with the NF-YC Complex to Regulate SOC1 Expression and Mediate Drought-Accelerated Flowering. *Molecular Plant*, 12(4), 489-505. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.002>

Iglesias, F. M., Bruera, N. A., Dergan-Dylon, S., Marino-Buslje, C., Lorenzi, H., Mateos, J. L., Turck, F., Coupland, G., & Cerdán, P. D. (2015). The Arabidopsis DNA Polymerase δ Has a Role in the Deposition of Transcriptionally Active Epigenetic Marks,

Development and Flowering. *PLOS Genetics*, 11(2), e1004975.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004975>

Ikedo, M., & Ohme-Takagi, M. (2009). A Novel Group of Transcriptional Repressors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(5), 970-975.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcp048>

Jacobs, W. P. (1988). Development of Procambium, Xylem, and Phloem in the Shoot Apex of Selaginella. *Botanical Gazette*, 149(1), 64-70. <https://doi.org/10.1086/337692>

Jang, S., Torti, S., & Coupland, G. (2009). Genetic and spatial interactions between *FT*, *TSF* and *SVP* during the early stages of floral induction in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 60(4), 614-625. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03986.x>

Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R., & Dean, C. (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5490), 344-347.
<https://doi.org/10.1126/science.290.5490.344>

Kagaya, Y., Ohmiya, K., & Hattori, T. (1999). RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 470-478.
<https://doi.org/10.1093/nar/27.2.470>

Kamachi, H., Iwasawa, O., Hickok, L. G., Nakayama, M., Noguchi, M., & Inoue, H. (2007). The effects of light on sex determination in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *Journal of Plant Research*, 120(5), 629-634. <https://doi.org/10.1007/s10265-007-0106-z>

Kim, D. H., Yamaguchi, S., Lim, S., Oh, E., Park, J., Hanada, A., Kamiya, Y., & Choi, G. (2008). SOMNUS, a CCCH-Type Zinc Finger Protein in *Arabidopsis*, Negatively Regulates Light-Dependent Seed Germination Downstream of PIL5. *The Plant Cell*, 20(5), 1260-1277. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058859>

Kim, D.-H., Doyle, M. R., Sung, S., & Amasino, R. M. (2009). Vernalization: Winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 277-299. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113411>

Kim, W.-Y., Ali, Z., Park, H. J., Park, S. J., Cha, J.-Y., Perez-Hormaeche, J., Quintero, F. J., Shin, G., Kim, M. R., Qiang, Z., Ning, L., Park, H. C., Lee, S. Y., Bressan, R. A., Pardo, J. M., Bohnert, H. J., & Yun, D.-J. (2013). Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in Arabidopsis. *Nature Communications*, 4(1), 1352. <https://doi.org/10.1038/ncomms2357>

Kimura, M., & Ohta, T. (1974). On some principles governing molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(7), 2848-2852. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.7.2848>

Kinoshita, A., & Richter, R. (2020). Genetic and molecular basis of floral induction in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 71(9), 2490-2504. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa057>

Knott, J. E. (1934). Effect of a localized photoperiod on spinach. *Proceedings American Society Hort Science*, 31, 152-154.

Kuai, B., Chen, J., & Hörtensteiner, S. (2018). The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. *Journal of Experimental Botany*, 69(4), 751-767. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx322>

Laibach, F. (1907). *Zur Frage nach der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich* (Vol. 22). Bot Centbl Beihefte.

Laibach, F. (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische. 44, 265-455.

Lawson, S. S., Pijut, P. M., & Michler, C. H. (2014). Comparison of arabidopsis stomatal density mutants indicates variation in water stress responses and potential epistatic

effects. *Journal of Plant Biology*, 57(3), 162-173. <https://doi.org/10.1007/s12374-014-0017-1>

Lee, I., Aukerman, M. J., Gore, S. L., Lohman, K. N., Michaels, S. D., Weaver, L. M., John, M. C., Feldmann, K. A., & Amasino, R. M. (1994). Isolation of LUMINIDEPENDENS: A Gene Involved in the Control of Flowering Time in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 6(1), 75. <https://doi.org/10.2307/3869676>

Lee, J. H., Kim, J. J., Kim, S. H., Cho, H. J., Kim, J., & Ahn, J. H. (2012). The E3 Ubiquitin Ligase HOS1 Regulates Low Ambient Temperature-Responsive Flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 53(10), 1802-1814. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs123>

Lee, J. H., Park, S. H., Lee, J. S., & Ahn, J. H. (2007). A conserved role of SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) in controlling flowering time of Brassica plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1769(7-8), 455-461. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.05.001>

Lee, J. H., Ryu, H.-S., Chung, K. S., Posé, D., Kim, S., Schmid, M., & Ahn, J. H. (2013). Regulation of Temperature-Responsive Flowering by MADS-Box Transcription Factor Repressors. *Science*, 342(6158), 628-632. <https://doi.org/10.1126/science.1241097>

Lee, J. H., Yoo, S. J., Park, S. H., Hwang, I., Lee, J. S., & Ahn, J. H. (2007). Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 21(4), 397-402. <https://doi.org/10.1101/gad.1518407>

Lee, J., & Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2247-2254. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq098>

Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E., & Yu, H. (2008). A Repressor Complex Governs the Integration of

Flowering Signals in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 15(1), 110-120.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.002>

Li, K., Wang, Y., Han, C., Zhang, W., Jia, H., & Li, X. (2007). GA signaling and CO/FT regulatory module mediate salt-induced late flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant Growth Regulation*, 53(3), 195-206. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9218-7>

Li, X.-J., Li, M., Zhou, Y., Hu, S., Hu, R., Chen, Y., & Li, X.-B. (2015). Overexpression of Cotton RAV1 Gene in Arabidopsis Confers Transgenic Plants High Salinity and Drought Sensitivity. *PLOS ONE*, 10(2), e0118056.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118056>

Liang, Y.-K., Dubos, C., Dodd, I. C., Holroyd, G. H., Hetherington, A. M., & Campbell, M. M. (2005). AtMYB61, an R2R3-MYB Transcription Factor Controlling Stomatal Aperture in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, 15(13), 1201-1206.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.041>

Lim, M.-H., Kim, J., Kim, Y.-S., Chung, K.-S., Seo, Y.-H., Lee, I., Kim, J., Hong, C. B., Kim, H.-J., & Park, C.-M. (2004). A New Arabidopsis Gene, *FLK*, Encodes an RNA Binding Protein with K Homology Motifs and Regulates Flowering Time via *FLOWERING LOCUS C* [W]. *The Plant Cell*, 16(3), 731-740.
<https://doi.org/10.1105/tpc.019331>

Lim, P. (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 8(6), 272-278. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00103-1)

Lim, P. O., Kim, H. J., & Gil Nam, H. (2007). Leaf Senescence. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 115-136. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316>

Long, J. A., Ohno, C., Smith, Z. R., & Meyerowitz, E. M. (2006). TOPLESS Regulates Apical Embryonic Fate in Arabidopsis. *Science*, 312(5779), 1520-1523.
<https://doi.org/10.1126/science.1123841>

Lopez-Vernaza, M., Yang, S., Müller, R., Thorpe, F., De Leau, E., & Goodrich, J. (2012). Antagonistic Roles of SEPALLATA3, FT and FLC Genes as Targets of the Polycomb Group Gene CURLY LEAF. *PLoS ONE*, 7(2), e30715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030715>

Lu, Q., Zhao, L., Li, D., Hao, D., Zhan, Y., & Li, W. (2014). A GmRAV Ortholog Is Involved in Photoperiod and Sucrose Control of Flowering Time in Soybean. *PLoS ONE*, 9(2), e89145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089145>

Ma, X., Sukiran, N., Ma, H., & Su, Z. (2014). Moderate drought causes dramatic floral transcriptomic reprogramming to ensure successful reproductive development in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14(1), 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-164>

Marchant, D. B., Sessa, E. B., Wolf, P. G., Heo, K., Barbazuk, W. B., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2019). The C-Fern (*Ceratopteris richardii*) genome: Insights into plant genome evolution with the first partial homosporous fern genome assembly. *Scientific Reports*, 9(1), 18181. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53968-8>

Marín-González, E., Matías-Hernández, L., Aguilar-Jaramillo, A. E., Lee, J. H., Ahn, J. H., Suárez-López, P., & Pelaz, S. (2015). SHORT VEGETATIVE PHASE Up-Regulates *TEMPRANILLO2* Floral Repressor at Low Ambient Temperatures. *Plant Physiology*, 169(2), 1214-1224. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00570>

Mateos, J. L., Madrigal, P., Tsuda, K., Rawat, V., Richter, R., Romera-Branchat, M., Fornara, F., Schneeberger, K., Krajewski, P., & Coupland, G. (2015). Combinatorial activities of SHORT VEGETATIVE PHASE and FLOWERING LOCUS C define distinct modes of flowering regulation in Arabidopsis. *Genome Biology*, 16(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0597-1>

Matías-Hernández, L., Aguilar-Jaramillo, A. E., Marín-González, E., Suárez-López, P., & Pelaz, S. (2014). RAV genes: Regulation of floral induction and beyond. *Annals of Botany*, 114(7), 1459-1470. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu069>

Matías-Hernández, L., Aguilar-Jaramillo, A. E., Osnato, M., Weinstain, R., Shani, E., Suárez-López, P., & Pelaz, S. (2016). TEMPRANILLO Reveals the Mesophyll as Crucial for Epidermal Trichome Formation. *Plant Physiology*, 170(3), 1624-1639. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01309>

Michaels, S. D. (2009). Flowering time regulation produces much fruit. *Current opinion in plant biology*, 12(1), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.09.005>

Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (2001). Loss of *FLOWERING LOCUS C* Activity Eliminates the Late-Flowering Phenotype of *FRIGIDA* and Autonomous Pathway Mutations but Not Responsiveness to Vernalization. *The Plant Cell*, 13(4), 935-941. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.935>

Mitchum, M. G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., & Sun, T. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *The Plant Journal*, 45(5), 804-818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02642.x>

Mittal, A., Gampala, S. S. L., Ritchie, G. L., Payton, P., Burke, J. J., & Rock, C. D. (2014). Related to ABA-Insensitive3(ABI3)/Viviparous1 and AtABI5 transcription factor coexpression in cotton enhances drought stress adaptation. *Plant Biotechnology Journal*, 12(5), 578-589. <https://doi.org/10.1111/pbi.12162>

Morris, J. L., Puttick, M. N., Clark, J. W., Edwards, D., Kenrick, P., Pressel, S., Wellman, C. H., Yang, Z., Schneider, H., & Donoghue, P. C. J. (2018). The timescale of early land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.1719588115>

Nam, J., Kim, J., Lee, S., An, G., Ma, H., & Nei, M. (2004). Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1910-1915. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308430100>

Nguyen, N. H., & Cheong, J.-J. (2018). AtMYB44 interacts with TOPLESS-RELATED corepressors to suppress protein phosphatase 2C gene transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 507(1-4), 437-442. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.057>

Noh, B., Lee, S.-H., Kim, H.-J., Yi, G., Shin, E.-A., Lee, M., Jung, K.-J., Doyle, M. R., Amasino, R. M., & Noh, Y.-S. (2004). Divergent Roles of a Pair of Homologous Jumonji/Zinc-Finger-Class Transcription Factor Proteins in the Regulation of Arabidopsis Flowering Time. *The Plant Cell*, 16(10), 2601-2613. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025353>

Noh, Y.-S., & Amasino, R. M. (1999). Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Molecular Biology*, 41(2), 181-194. <https://doi.org/10.1023/A:1006342412688>

Osnato, M., Castillejo, C., Matías-Hernández, L., & Pelaz, S. (2012). TEMPRANILLO genes link photoperiod and gibberellin pathways to control flowering in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3(1), 808. <https://doi.org/10.1038/ncomms1810>

Osnato, M., Lacchini, E., Pilatone, A., Dreni, L., Grioni, A., Chiara, M., Horner, D., Pelaz, S., & Kater, M. M. (2021). Transcriptome analysis reveals rice MADS13 as an important repressor of the carpel development pathway in ovules. *Journal of Experimental Botany*, 72(2), 398-414. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa460>

Osnato, M., Matias-Hernandez, L., Aguilar-Jaramillo, A. E., Kater, M. M., & Pelaz, S. (2020). Genes of the *RAV* Family Control Heading Date and Carpel Development in Rice. *Plant Physiology*, 183(4), 1663-1680. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00562>

Park, H. J., Kim, W.-Y., Pardo, J. M., & Yun, D.-J. (2016). Molecular Interactions Between Flowering Time and Abiotic Stress Pathways. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 327, 371-412. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.07.001>

Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Pérez, A. C., Chico, J. M., Bossche, R. V., Sewell, J., Gil, E., García-Casado, G., Witters, E., Inzé, D., Long, J. A., De Jaeger, G., Solano, R., & Goossens, A. (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature*, 464(7289), 788-791. <https://doi.org/10.1038/nature08854>

Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200-203. <https://doi.org/10.1038/35012103>

Peng, Z., Wang, M., Zhang, L., Jiang, Y., Zhao, C., Shahid, M. Q., Bai, Y., Hao, J., Peng, J., Gao, Y., Su, W., & Yang, X. (2021). EjRAV1/2 Delay Flowering Through Transcriptional Repression of EjFTs and EjSOC1s in Loquat. *Frontiers in Plant Science*, 12, 816086. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.816086>

Plackett, A. R. G., Rabbinowitsch, E. H., & Langdale, J. A. (2015). Protocol: Genetic transformation of the fern *Ceratopteris richardii* through microparticle bombardment. *Plant Methods*, 11(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0080-8>

Plant, A. R., Larrieu, A., & Causier, B. (2021). Repressor for hire! The vital roles of TOPLESS-mediated transcriptional repression in plants. *New Phytologist*, 231(3), 963-973. <https://doi.org/10.1111/nph.17428>

Poethig, R. S. (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* (New York, N.Y.), 250(4983), 923-930. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.923>

Poethig, R. S. (2010). The Past, Present, and Future of Vegetative Phase Change. *Plant Physiology*, 154(2), 541-544. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161620>

Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G. C., Immink, R. G. H., & Schmid, M. (2013). Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature*, 503(7476), 414-417. <https://doi.org/10.1038/nature12633>

Prosdocimi, F., & de Farias, S. T. (2023). Origin of life: Drawing the big picture. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 180-181, 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2023.04.005>

Pucker, B., Kleinbölting, N., & Weisshaar, B. (2021). Large scale genomic rearrangements in selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis. *BMC Genomics*, 22(1), 599. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07877-8>

Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., & Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80(6), 847-857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90288-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90288-0)

Qi, T., Huang, H., Song, S., & Xie, D. (2015). Regulation of Jasmonate-Mediated Stamen Development and Seed Production by a bHLH-MYB Complex in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27(6), 1620-1633. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00116>

Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C., & Conti, L. (2013). GIGANTEA Enables Drought Escape Response via Absciscic Acid-Dependent Activation of the Florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1. *PLANT PHYSIOLOGY*, 162(3), 1706-1719. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217729>

Riboni, M., Robustelli Test, A., Galbiati, M., Tonelli, C., & Conti, L. (2016). ABA-dependent control of *GIGANTEA* signalling enables drought escape via up-regulation of *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6309-6322. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw384>

Riechmann, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*, 379(6), 633-646. <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.6.633>

- Rodriguez-Concepcion, M. (2004). The MEP Pathway: A New Target for the Development of Herbicides, Antibiotics and Antimalarial Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, 10(19), 2391-2400. <https://doi.org/10.2174/1381612043384006>
- Ruban, A. V. (2016). Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching: Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage. *Plant Physiology*, 170(4), 1903-1916. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01935>
- Sachs, J. (1865). *Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen: Untersuchungen über die allgemeinen Lebensbedingungen der Pflanzen und die Functionen ihrer Organe* (pp. 1-536). W. Engelmann. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/197154>
- Sawa, M., & Kay, S. A. (2011). GIGANTEA directly activates *Flowering Locus T* in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11698-11703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106771108>
- Scheumann, V., Schoch, S., & Rüdiger, W. (1999). Chlorophyll b reduction during senescence of barley seedlings. *Planta*, 209(3), 364-370. <https://doi.org/10.1007/s004250050644>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schweiger, R., & Schwenkert, S. (2014). Protein-protein Interactions Visualized by Bimolecular Fluorescence Complementation in Tobacco Protoplasts and Leaves. *Journal of Visualized Experiments*, 85, 51327. <https://doi.org/10.3791/51327>
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J.-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6896-6901. <https://doi.org/10.1073/pnas.120170197>

- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Zhu, J.-K. (2002). The Putative Plasma Membrane Na^+/H^+ Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na^+ Transport in Plants. *The Plant Cell*, 14(2), 465-477. <https://doi.org/10.1105/tpc.010371>
- Shpak, E. D., McAbee, J. M., Pillitteri, L. J., & Torii, K. U. (2005). Stomatal Patterning and Differentiation by Synergistic Interactions of Receptor Kinases. *Science*, 309(5732), 290-293. <https://doi.org/10.1126/science.1109710>
- Shu, K., Zhou, W., Chen, F., Luo, X., & Yang, W. (2018). Absciscic Acid and Gibberellins Antagonistically Mediate Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 416. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00416>
- Simonin, K. A., & Roddy, A. B. (2018). Genome downsizing, physiological novelty, and the global dominance of flowering plants. *PLOS Biology*, 16(1), e2003706. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003706>
- Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2016). The Role and Regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in Plant Development, Abiotic Stress Responses and Phytohormone Crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01884>
- Sohn, K. H., Lee, S. C., Jung, H. W., Hong, J. K., & Hwang, B. K. (2006). Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 61(6), 897-915. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0057-0>
- Srikanth, A., & Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2013-2037. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0673-y>
- Su, Z., Ma, X., Guo, H., Sukiran, N. L., Guo, B., Assmann, S. M., & Ma, H. (2013). Flower Development under Drought Stress: Morphological and Transcriptomic Analyses

Reveal Acute Responses and Long-Term Acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(10), 3785-3807. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115428>

Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 410(6832), 1116-1120. <https://doi.org/10.1038/35074138>

Sun, F., Yu, H., Qu, J., Cao, Y., Ding, L., Feng, W., Khalid, M. H. B., Li, W., & Fu, F. (2020). Maize ZmBES1/BZR1-5 Decreases ABA Sensitivity and Confers Tolerance to Osmotic Stress in Transgenic *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 996. <https://doi.org/10.3390/ijms21030996>

Székely, G., Ábrahám, E., Cséplő, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., Koncz, C., & Szabados, L. (2008). Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal*, 53(1), 11-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03318.x>

Telfer, A., Bollman, K. M., & Poethig, R. S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124(3), 645-654. <https://doi.org/10.1242/dev.124.3.645>

Tiwari, S. B., Shen, Y., Chang, H., Hou, Y., Harris, A., Ma, S. F., McPartland, M., Hymus, G. J., Adam, L., Marion, C., Belachew, A., Repetti, P. P., Reuber, T. L., & Ratcliffe, O. J. (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the *FLOWERING LOCUS T* promoter via a unique *cis* -element. *New Phytologist*, 187(1), 57-66. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03251.x>

Tooke, F., Ordidge, M., Chiurugwi, T., & Battey, N. (2005). Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2587-2599. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri254>

Torii, K. U. (2021). Stomatal development in the context of epidermal tissues. *Annals of Botany*, 128(2), 137-148. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab052>

Tracy, F. E., Gilliam, M., Dodd, A. N., Webb, A. A. R., & Tester, M. (2008). NaCl-induced changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant, Cell & Environment*, 31(8), 1063-1073. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01817.x>

Turck, F., Fornara, F., & Coupland, G. (2008). Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 573-594. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092755>

Tzvetkova-Chevolleau, T., Franck, F., Alawady, A. E., Dall'Osto, L., Carrière, F., Bassi, R., Grimm, B., Nussaume, L., & Havaux, M. (2007). The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 50(5), 795-809. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03090.x>

Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5660), 1003-1006. <https://doi.org/10.1126/science.1091761>

VanGessel, C., Hamilton, J., Tabbita, F., Dubcovsky, J., & Pearce, S. (2022). Transcriptional signatures of wheat inflorescence development. *Scientific Reports*, 12(1), 17224. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21571-z>

Vaughn, K. C., Hickok, L. G., Warne, T. R., & Farrow, A. C. (1990). Structural Analysis and Inheritance of a Clumped Chloroplast Mutant in the Fern *Ceratopteris*. *Journal of Heredity*, 81(2), 146-151. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110947>

Von Groll, U., Berger, D., & Altmann, T. (2002). The Subtilisin-Like Serine Protease SDD1 Mediates Cell-to-Cell Signaling during Arabidopsis Stomatal Development. *The Plant Cell*, 14(7), 1527-1539. <https://doi.org/10.1105/tpc.001016>

- Wada, K. C., & Takeno, K. (2010). Stress-induced flowering. *Plant Signaling & Behavior*, 5(8), 944-947. <https://doi.org/10.4161/psb.5.8.11826>
- Wang, H., Li, Y., Pan, J., Lou, D., Hu, Y., & Yu, D. (2017). The bHLH Transcription Factors MYC2, MYC3, and MYC4 Are Required for Jasmonate-Mediated Inhibition of Flowering in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 10(11), 1461-1464. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.007>
- Wang, S., Guo, T., Shen, Y., Wang, Z., Kang, J., Zhang, J., Yi, F., Yang, Q., & Long, R. (2021). Overexpression of MtRAV3 enhances osmotic and salt tolerance and inhibits growth of Medicago truncatula. *Plant Physiology and Biochemistry*, 163, 154-165. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.003>
- Wang, X., Morton, J. A., Pellicer, J., Leitch, I. J., & Leitch, A. R. (2021). Genome downsizing after polyploidy: Mechanisms, rates and selection pressures. *The Plant Journal*, 107(4), 1003-1015. <https://doi.org/10.1111/tpj.15363>
- Wang, X.-H., Li, Q.-T., Chen, H.-W., Zhang, W.-K., Ma, B., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2014). Trihelix transcription factor GT-4 mediates salt tolerance via interaction with TEM2 in Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14(1), 339. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0339-7>
- Wilson, R. N., Heckman, J. W., & Somerville, C. R. (1992). Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis thaliana* under Short Days. *Plant Physiology*, 100(1), 403-408. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.403>
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576-4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>

- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J.-W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138(4), 750-759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>
- Wu, G., & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development (Cambridge, England)*, 133(18), 3539-3547. <https://doi.org/10.1242/dev.02521>
- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G., & Ren, D. (2008). Activation of MAPK Kinase 9 Induces Ethylene and Camalexin Biosynthesis and Enhances Sensitivity to Salt Stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 26996-27006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801392200>
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., & Yokoyama, S. (2004). Solution Structure of the B3 DNA Binding Domain of the *Arabidopsis* Cold-Responsive Transcription Factor RAV1[W]. *The Plant Cell*, 16(12), 3448-3459. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026112>
- Yant, L., Mathieu, J., & Schmid, M. (2009). Just say no: Floral repressors help *Arabidopsis* bide the time. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 580-586. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.006>
- Yu, D., Dong, X., Zou, K., Jiang, X.-D., Sun, Y.-B., Min, Z., Zhang, L.-P., Cui, H., & Hu, J.-Y. (2023). A hidden mutation in the seventh WD40-repeat of COP1 determines the early flowering trait in a set of *Arabidopsis myc* mutants. *The Plant Cell*, 35(1), 345-350. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac319>
- Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2022). Plant responses to multifactorial stress combination. *New Phytologist*, 234(4), 1161-1167. <https://doi.org/10.1111/nph.18087>
- Zeevaart, J. A. D. (2009). My journey from horticulture to plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 1-19. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092010>

Zhang, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Li, D., Li, Q., Yue, M., Li, Q., Zhang, Y., Xu, Y., Xue, Y., Chong, K., & Bao, S. (2011). Arabidopsis floral initiator SKB1 confers high salt tolerance by regulating transcription and pre-mRNA splicing through altering histone H4R3 and small nuclear ribonucleoprotein LSM4 methylation. *The Plant Cell*, 23(1), 396-411. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081356>

Zhao, S.-P., Xu, Z.-S., Zheng, W.-J., Zhao, W., Wang, Y.-X., Yu, T.-F., Chen, M., Zhou, Y.-B., Min, D.-H., Ma, Y.-Z., Chai, S.-C., & Zhang, X.-H. (2017). Genome-Wide Analysis of the RAV Family in Soybean and Functional Identification of GmRAV-03 Involvement in Salt and Drought Stresses and Exogenous ABA Treatment. *Frontiers in Plant Science*, 8, 905. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00905>

Zhou, C., Cai, Z., Guo, Y., & Gan, S. (2009). An Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade, MKK9-MPK6, Plays a Role in Leaf Senescence. *Plant Physiology*, 150(1), 167-177. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133439>

Zhou, P., Qu, Y., Wang, Z., Huang, B., Wen, Q., Xin, Y., Ni, Z., & Xu, L. (2023). Gene Structural Specificity and Expression of MADS-Box Gene Family in *Camellia chekiangoleosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3434. <https://doi.org/10.3390/ijms24043434>

Zhou, Y.-P., Duan, J., Fujibe, T., Yamamoto, K. T., & Tian, C.-E. (2012). AtIQM1, a novel calmodulin-binding protein, is involved in stomatal movement in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 79(4-5), 333-346. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9915-0>

Zhu, Y., Chen, L., Zhang, C., Hao, P., Jing, X., & Li, X. (2017). Global transcriptome analysis reveals extensive gene remodeling, alternative splicing and differential transcription profiles in non-seed vascular plant *Selaginella moellendorffii*. *BMC Genomics*, 18(S1), 1042. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3266-1>

Zoulas, N., Harrison, E. L., Casson, S. A., & Gray, J. E. (2018). Molecular control of stomatal development. *Biochemical Journal*, 475(2), 441-454.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20170413>

Anexos

Figura 63. Número de RAVs asociados a estrés abiótico en cada especie mediante revisión bibliográfica

Especie	RAVs relacioandos con respuesta a estrés
<i>Klebsormidium</i>	1
<i>Physcomitrium patens</i>	2
<i>Selaginella moellendorffii</i>	2
<i>Ceratopteris richardii</i>	5
<i>Cycas sphaerica</i>	1
<i>Ginkgo biloba</i>	5
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	1
<i>Sequoia</i>	1
<i>Amborella trichopoda</i>	1
<i>Aristolochia fimbriata</i>	1
<i>Eschscholzia californica</i>	5
<i>Oryza sativa</i>	2
<i>Triticum turgidum subsp. Duru</i>	1
<i>Capsicum annuum</i>	1
<i>Nicotiana tabacum</i>	1
<i>Solanum lycopersicum</i>	1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	6
<i>Brassica napus</i>	1
<i>Citrus clementina</i>	1
<i>Gossypium hirsutum</i>	1
<i>Poncirus trifoliata</i>	1
<i>Thellungiella salsuginea</i>	8
<i>Betula platyphylla</i>	1
<i>Cucumis melo</i>	1
<i>Eriobotrya japonica</i>	2
<i>Glycine max</i>	1
<i>Galega orientalis</i>	1
<i>Manihot esculenta</i>	2
<i>Medicago truncatula</i>	3

Figura 64. Listado de óligos utilizados en el desarrollo de este trabajo

Gen	Secuencia	Función
ABI5 for	CAGTGGAATTGGAAGCTGAA	RT-qPCR
ABI5 rev	GCAATCTCCCGTTCGATTT	RT-qPCR
AOC1 201 for	CTCTCAGAACTTGGGAAATAC	RT-qPCR
AOC1 340 rev	GATCTCCGAGACCAAAACCTA	RT-qPCR
AOC2 272 for	AATTAGATCGACACAGCCCCAAG	RT-qPCR
AOC2 332 rev	CCGAGACCGAACATTAAGCTGA	RT-qPCR
CO for	TCCATTAACCATAACGCATACATTTC	RT-qPCR
CO rev	CGGCACAACACCAGTTTCC	RT-qPCR
CrRAC2 for	GAGGAACCTCCATCGCTACG	<i>in situ</i>
CrRAC2 rev	AGTCGGCGGATATGCACAAT	<i>in situ</i>
CrRAV1 for	GCGTATTCTCCACTATCCGA	<i>in situ</i>
CrRAV1 for	GCACTGATGACAATACGCCG	RT-qPCR
CrRAV1 rev	TTCAGCGGTTCCCGTAAGAC	<i>in situ</i>
CrRAV1 rev	GAGTCACCCTCCGTACTCCT	RT-qPCR
CrRAV2 for	GGATTTTCATCAAGTTCGCAGC	RT-qPCR
CrRAV2 rev	ACTTTCCTGGAGTCGTCCG	RT-qPCR
CrRAV3 for	AAGTCAGGTGAGTCGATGGC	<i>in situ</i>
CrRAV3 for	GCGCACACTAAATCGGAAGT	RT-qPCR
CrRAV3 rev	TTACGCATGACTGGAGAGGC	<i>in situ</i>
CrRAV3 rev	GACTCAGCAACTTCAGACGC	RT-qPCR
CrRAV4 for	TGACGACCTGATCCAATCCG	<i>in situ</i>
CrRAV4 for	AATGGCAGTGTGAGCAGCTA	RT-qPCR
CrRAV4 rev	ATCAGCGCCGTATTCTCGC	<i>in situ</i>
CrRAV4 rev	TCGACTGATCCTCTTGTTTCAGC	RT-qPCR
CrRAV5 for	GCTCCCTCTCCGTTAATCCG	<i>in situ</i>
CrRAV5 for	CCGATCCAGAAGGATGGCTG	RT-qPCR
CrRAV5 rev	CGTTGCATAGCGAACTGGTG	<i>in situ</i>
CrRAV5 rev	TCGATATCCGAGGCACGAAC	RT-qPCR
CrUBQ10 for	GCAGCGCCTCATCTTTGC	RT-qPCR
CrUBQ10 rev	CCACGAAGCCTAAGGACGAG	RT-qPCR
eIF4A 1418 for	TGACCACACAGTCTCTGCAA	RT-qPCR
eIF4A 1568 rev	ACCAGGGAGACTTGTTGGAC	RT-qPCR
ELIP2 348 for	CCACCAGTTAGCAAGCCTAAGGTG	RT-qPCR
ELIP2 410 rev	TGGACCGCTAAACGCTAGCAAATC	RT-qPCR
FT for	CCATTGGTTGGTGACTGATATCC	RT-qPCR
FT rev	TTGCCAAAGGTTGTTCCAGTT	RT-qPCR
GA3ox1 for	AGGAGAAGGAGCAGCGGAGAAGAGGAG	RT-qPCR
GA3ox1 rev	CATCCCATTCACCTCCCACACTCTCACATAC	RT-qPCR

Gen	Secuencia	Función
GA3ox2 for	GACTTGCTCCACATTTTAACCAACGGAATCTTC	RT-qPCR
GA3ox2 rev	CCACAGGTAAGCCATTGAGAACCGAGATC	RT-qPCR
GI for	CGGAAAACCTATGGCCTGTG	Genotipado
GI rev	CCGAAGAAGGGCATTGAAGAG	Genotipado
G-TMT for	ATCCCTGACTTCGTCACGTT	RT-qPCR
G-TMT rev	AGCGATGACTTTGAGCCGAA	RT-qPCR
HAI1 205 rev	TCCTCCGCCTCTGTAAAGTCA	RT-qPCR
HAI1 69 for	AACGACGACAACGAGGAGAC	RT-qPCR
LOX2 for	CACCTGACGAAGAGTACATTGG	RT-qPCR
LOX2 rev	GTAACACCATGCTCAGAGGTAGG	RT-qPCR
LOX3 for	TGAACATTGAGAGAGTCAAGACTTTT	RT-qPCR
LOX3 rev	AGATAGTTCGAGTAGCATAGGCTTTGC	RT-qPCR
LOX4 for	TCGCTAACTTTGGTGAGATCGATAG	RT-qPCR
LOX4 rev	TCGTCATCTCGAAGCATGCATATT	RT-qPCR
MKK9 for	CCTCCTCAGCCACCACCACC	RT-qPCR
MKK9 rev	CACTTAACGACGTACGGTGAATCTG	RT-qPCR
MYC2 for	ACGACGGCGACGACTGAAACAAC	Genotipado
MYC2 rev	CCGGGTTTCCGGAGCTTCGTTTA	Genotipado
MYC3 for	AAGGTGGGTGTGTTGAAATCTAATG	Genotipado
MYC3 rev	TCAATAGTTTTCTCCGACTTTC	Genotipado
MYC4 for	ATGTCTCCGACGAATGTTCA	Genotipado
MYC4 rev	AACCAAATTCACCACCACCAT	Genotipado
SAG12 714 for	ACAAAGGCGAAGACGCTACTTG	RT-qPCR
SAG12 795 rev	ACCGGGACATCCTCATAACCTG	RT-qPCR
SmRAV2 for	AAAAGGTACCATGAACGATCGCTACTCTCC	Clonación
SmRAV2 rev	AAAATCTAGATTAATACGGGCTGGAAAGATC	Clonación
SOC1 for	AGCTGCAGAAAACGAGAAGCTCTCTG	RT-qPCR
SOC1 rev	GGGCTACTCTCTTCATCACCTCTTCC	RT-qPCR
SVP for	GACCCACTAGTTATCAGCTCAG	Genotipado
SVP rev	AAGTTATGCCTCTCTAGGAC	Genotipado
svp-31 for	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Genotipado
svp-31 rev	TGCAAACCAAATCCACAAAA	Genotipado
TEM1 for	ATCCACTGGAAAGTCCGGTCTA	RT-qPCR
TEM1 for	GATGTCGTAAGAAGACGCAGC	Genotipado
TEM1 rev	GAATAGCCTAACCACAGTCTGAACC	RT-qPCR
TEM1 rev	TCAATAATATCGGGCGAAATG	Genotipado
<i>tem1-1 for</i>	GATGTCGTAAGAAGACGCAGC	Genotipado
tem1-1 rev	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Genotipado
TEM2 for	TGGTCCGAGAGAAAAACCCG	RT-qPCR
TEM2 for	TTACGCCTCTACCGGATGGG	Genotipado

Gen	Secuencia	Función
TEM2 rev	TCAACTCCGAAAAGCCGAAC	RT-qPCR
TEM2 rev	GCTTCTTGGAACACCGTAACGC	Genotipado
tem2-2 for	GCTTCTTGGAACACCGTAACGC	Genotipado
tem2-2 rev	CGTGTGCCAGGTGCCCACGGAATAGT	Genotipado
TSF1 for	GAGTCCAAGCAACCCTCACCAA	RT-qPCR
TSF1 rev	CACAATACGATGAATTCCCGAG	RT-qPCR

