

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Biociències  
Dep. de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia



# CONTROL DE LA FLORACIÓN POR LOS GENES TEMPRANILLO EN RESPUESTA A SEÑALES AMBIENTALES Y ENDÓGENAS

TESIS DOCTORAL

Esther Marín González

Septiembre 2013



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Biociències  
Dept. Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia  
Estudis de Doctorat en Biologia i Biotecnologia Vegetal

## TESIS DOCTORAL

# **CONTROL DE LA FLORACIÓN POR LOS GENES *TEMPRANILLO* EN RESPUESTA A SEÑALES AMBIENTALES Y ENDÓGENAS**

Memoria presentada por Esther Marín González para optar al grado de  
Doctor en Biología y Biotecnología Vegetal por la  
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Realizada en el Centre de Recerca en Agrigenòmica (Crag), Bellaterra.

Directoras

Tutor

Dra. Soraya Pelaz Herrero

Dra. Paula Suárez López

Dr. Juan Barceló Coll

Autora y candidata a Dra.

Esther Marín González

Barcelona, Septiembre de 2013

## ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
1. TRANSICIONES ENTRE FASES DE DESARROLLO EN LAS PLANTAS.....	1
1.1 <i>Transición de la fase juvenil a la fase adulta durante el crecimiento vegetativo.....</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Transición de la fase vegetativa a la reproductiva: la transición floral.....</i>	<i>2</i>
2. RUTAS DE CONTROL DE LA FLORACIÓN .....	3
2.1 <i>Factores endógenos: miRNAs.....</i>	<i>4</i>
2.2 <i>Factores ambientales: luz y temperatura .....</i>	<i>4</i>
2.2.1 Regulación por la luz.....	5
• Ruta del fotoperiodo: módulo CO/FT en LD .....	5
• Ruta de las hormonas giberelinas en SD.....	7
2.2.2 Ruta de la temperatura ambiental .....	8
3. INTERACCIÓN ENTRE LAS DISTINTAS RUTAS .....	9
4. LA IMPORTANCIA DE LOS REPRESORES DURANTE EL DESARROLLO .....	10
5. LOS GENES <i>TEMPRANILLO</i> Y <i>RAV1</i> .....	11
6. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA FLORACIÓN EN OTRA PLANTA MODELO: <i>POPULUS SP</i> .....	13
<b>OBJETIVOS GENERALES .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 1: SEÑALES ENDÓGENAS: MIR156 Y MIR172 .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
1. TRANSICIONES ENTRE LAS DISTINTAS FASES DEL DESARROLLO .....	17
2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS MICRORNAS .....	18
3. FUNCIÓN DE MIR156 Y MIR172 EN EL CONTROL DE LA FASE JUVENIL Y LA FLORACIÓN.....	20
3.1 <i>Función del módulo miR156/SPL en el control de la transición de fase juvenil a adulta y la inducción floral.....</i>	<i>21</i>
3.1.1 MIR156 mantiene la fase juvenil y retrasa la transición floral.....	22
3.1.2 Los genes <i>SPLs</i> promueven la fase adulta y la inducción floral.....	23
3.2 <i>Función del módulo miR172/AP2 en el control de la transición y el desarrollo floral.....</i>	<i>26</i>
3.3 <i>Regulación de miR156 y miR172 .....</i>	<i>28</i>
4. LOS GENES <i>TEMPRANILLO</i> Y SU PARTICIPACIÓN EN EL CONTROL DE LAS TRANSICIONES DURANTE EL DESARROLLO.....	29
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
1. BÚSQUEDA BIOINFORMÁTICA DE SECUENCIAS DE UNIÓN ENTRE MIRNAS/SPLS Y LOS GENES TEM/RAV .....	33
1.1 <i>Estudio de los promotores de TEM1, TEM2 y RAV .....</i>	<i>33</i>
1.1.1 Predicción de posibles sitios de unión para miRNAs.....	33
1.1.2 Predicción de posibles sitios de unión para SPLs.....	34
1.2 <i>Estudio de las secuencias de MIR156, MIR172 y SPL .....</i>	<i>36</i>
2. RELACIÓN ENTRE TEM/RAV1 Y MIR156.....	37
2.1 <i>Regulación de la expresión de TEM/RAV en plantas 35S::MIR156 y 35S::MIM15637</i>	<i>40</i>
2.2 <i>Regulación de la acumulación de miR156 por la acción de TEM.....</i>	<i>40</i>
3. RELACIÓN ENTRE TEM/RAV1 Y SPL.....	41
3.1 <i>Regulación de la expresión de TEM/RAV por SPLs.....</i>	<i>41</i>
3.2 <i>Regulación de la expresión de SPL9 por TEM .....</i>	<i>42</i>
4. RELACIÓN ENTRE TEM/RAV1 Y MIR172.....	45
4.1 <i>Regulación de la expresión de TEM/RAV en plantas 35S::MIM172.....</i>	<i>45</i>
4.2 <i>Regulación de la acumulación de miR172 por la acción de TEM.....</i>	<i>46</i>
5. ESTUDIOS FENOTÍPICOS DE TIEMPO DE FLORACIÓN, DURACIÓN DE LAS FASES JUVENIL Y ADULTA Y VELOCIDAD DE PRODUCCIÓN DE HOJAS .....	48

5.1 Tiempo de floración .....	48
5.2 Duración de la fase juvenil: juvenilidad .....	51
5.3 Velocidad de producción hojas .....	54
6. CONFIRMACIÓN GENÉTICA DE LA RELACIÓN ENTRE LA RUTA DE MIRNAS Y TEM .....	57
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
1. TEM1 regula positivamente a miR156 y éste requiere a TEM1 para regular el tiempo de floración.....	59
2. TEM reprime directamente, y probablemente también de forma indirecta, la expresión de SPL9.....	61
3. TEM reprime directamente, y probablemente también de forma indirecta, la expresión de MIR172C.....	62
4. TEM1 y TEM2 regulan el tiempo de floración a través de la ruta de miR156, SPL9 y miR172 .....	63
5. TEM1 y TEM2 controlan la duración de la fase juvenil y de la fase adulta .....	65
6. RAV1 y su implicación en la ruta de miR156/miR172 .....	66
7. TEM1 y RAV1 regulan negativamente la velocidad de iniciación de las hojas .....	67
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO 2: SEÑALES AMBIENTALES: LUZ Y TEMPERATURA.....</b>	<b>80</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>81</b>
1. RUTA DE LA LUZ COMO REGULADORA DE LA FLORACIÓN .....	81
1.1 Percepción de la luz por los fotorreceptores: fitocromos.....	81
1.2 Ruta de la calidad de la luz y floración .....	83
1.3 Componentes de la señalización mediada por phyB .....	84
1.3.1 Phytochrome Interacting Factors (PIF): PIF4 y PIF5 .....	85
1.3.2 Vascular One-Zinc finger (VOZ) .....	88
2. RUTA DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL.....	89
2.1 Regulación de la floración por bajas temperaturas en condiciones favorables de fotoperiodo (LD y 16°C).....	90
2.1.1 Inductores florales a 16°C: genes de la familia de FT .....	91
2.1.2 Represores florales a 16°C: SVP.....	91
2.2 Regulación de la floración por altas temperaturas en condiciones desfavorables de fotoperiodo (SD y 27°C).....	93
3. INTEGRACIÓN DE LAS RUTAS DE LUZ Y TEMPERATURA .....	94
3.1 phyB y bajas temperaturas.....	95
3.2 PIF4 y altas temperaturas.....	96
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>97</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>98</b>
<b>I. EFECTO DE LA REGULACIÓN POR LA LUZ.....</b>	<b>98</b>
1. PAPEL DE LOS FITOCROMOS EN LA REGULACIÓN DE TEM/RAV .....	98
1.1 Efecto de otros fitocromos y de la sombra simulada en TEM y RAV1.....	100
1.2 Regulación temporal de los niveles de TEM/RAV en plantas deficientes en phyB104	
1.3 Regulación espacial de los niveles de TEM1 en plantas deficientes en phyB.....	109
1.4 Regulación del tiempo de floración por los mutantes phyB y tem .....	110
2. REGULADORES EN LA RUTA DE LOS FITOCROMOS: PIFs Y VOZ .....	113
2.1 Phytochrome Interacting Factors (PIF).....	113
2.2 Identificación de posibles proteínas reguladoras de TEM1 .....	118
2.3 Vascular One- Zinc finger (VOZ).....	122
<b>II. EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL .....</b>	<b>127</b>

❖ FUNCIÓN DE TEMPRANILLO EN LA RESPUESTA DE LA FLORACIÓN A TEMPERATURAS BAJAS (LD A 16°C) .....	127
1. EFECTO DE LA TEMPERATURA BAJA SOBRE <i>TEM</i> / <i>RAV</i> .....	128
1.1 Regulación de la expresión de <i>TEM</i> / <i>RAV</i> a lo largo de 24 horas .....	128
1.2 Regulación de la expresión de <i>TEM</i> / <i>RAV</i> a lo largo del desarrollo .....	131
1.3 Regulación del tiempo de floración de los mutante <i>tem/rav</i> .....	133
2. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE <i>TEM</i> Y <i>SVP</i> EN LA FLORACIÓN .....	134
2.1 Efecto de <i>TEM</i> sobre <i>SVP</i> .....	136
2.2 Efecto de <i>SVP</i> sobre <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> .....	137
2.3 Análisis de la interacción genética entre <i>svp</i> y <i>tem</i> .....	140
3. EFECTO DE LOS <i>TEM</i> SOBRE LOS ACTIVADORES FLORALES <i>FT</i> Y <i>TSF</i> .....	143
❖ FUNCIÓN DE TEMPRANILLO EN LA RESPUESTA DE LA FLORACIÓN A TEMPERATURAS ALTAS (SD A 27°C) .....	147
1. EFECTO DE LA TEMPERATURA ALTA SOBRE <i>TEM</i> .....	148
1.1 Regulación temporal y espacial de los niveles de <i>TEM</i> .....	148
1.2. Regulación temporal de <i>FT</i> .....	150
2. EFECTO DE <i>TEM1</i> Y <i>TEM2</i> EN LA FLORACIÓN .....	151
<b>III. INTEGRACIÓN DE LAS RUTAS DE LA LUZ Y LA TEMPERATURA</b> .....	<b>154</b>
1. REGULACIÓN DE <i>TEM</i> EN PLANTAS MUTANTES <i>PHYB</i> CULTIVADAS A 16°C .....	154
2. RELACIÓN DE <i>PHYB</i> Y <i>TEM</i> A ALTAS TEMPERATURAS (SD Y 27°C) .....	156
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>159</b>
<b>I. LOS GENES <i>TEM</i> ESTÁN REGULADOS POR LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA LUZ</b> .....	<b>159</b>
1. <i>PHYB</i> REGULA POSITIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE <i>TEM1</i> Y AMBOS CONTROLAN LA FLORACIÓN DE MANERA PARCIALMENTE INDEPENDIENTE .....	159
2. EL ADELANTO DE LA FLORACIÓN EN LAS PLANTAS <i>35S::PIF5</i> PODRÍA RELACIONARSE CON UN DESCENSO EN LOS NIVELES DE <i>TEM</i> .....	161
3. VOZ PODRÍA CONTROLAR EL TIEMPO DE FLORACIÓN A TRAVÉS DE <i>TEM1</i> EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE <i>PHYB</i> EN LD .....	162
<b>II. LOS GENES <i>TEM</i> ESTÁN REGULADOS POR LAS BAJAS Y ALTAS TEMPERATURAS AMBIENTALES</b> .....	<b>163</b>
1. <i>TEM</i> REGULA LA FLORACIÓN A 22°C Y 16°C DE FORMA PARCIALMENTE DEPENDIENTE A <i>SVP</i> .....	163
2. LAS ALTAS TEMPERATURAS REDUCEN LOS NIVELES DE <i>TEM</i> .....	166
<b>III. <i>TEM</i> INTEGRA LA INFORMACIÓN DE LAS RUTAS DE LA LUZ Y LA TEMPERATURA</b> .....	<b>168</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>170</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>172</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>178</b>
<b>CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES <i>TEM</i>/<i>RAV</i> EN LA ESPECIE MODELO <i>POPULUS SP</i></b> .....	<b>189</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>190</b>
1. CICLO VITAL DE ÁRBOLES DEL GÉNERO <i>POPULUS</i> .....	190
1.1 Control de la fase juvenil .....	190
1.2 Crecimiento y floración .....	191
1.3 Parada estacional del crecimiento .....	194
1.4 Dormancia .....	196
2. GENES DE LA FAMILIA <i>RAV</i> EN ESPECIES LEÑOSAS .....	196
<b>MANUSCRITO</b> .....	<b>197</b>

<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>229</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>230</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>232</b>
1. LOS GENES TEM CONECTAN LA INFORMACIÓN DE DIFERENTES RUTAS DE CONTROL DE LA FLORACIÓN.....	232
2. RAV1 NO ESTÁ IMPLICADO EN LA REGULACIÓN DE LA FLORACIÓN .....	235
3. LOS GENES DE LA FAMILIA <i>RAV</i> <i>PTRAV1/PTRAV2</i> DE <i>POPULUS</i> ESTÁN IMPLICADOS EN PROCESOS DE DESARROLLO Y FORMACIÓN DE YEMAS DURMIENTES.....	236
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>238</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>239</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</b> .....	<b>267</b>
<b>PUBLICACIONES</b> .....	<b>273</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la regulación transcripcional y post-transcripcional de la proteína CONSTANS.....	6
Figura 2. Esquema de las diferentes rutas genéticas que regulan la floración en <i>Arabidopsis</i> .....	9
Figura 3. Esquema de las rutas y genes con los que hemos trabajado a lo largo de esta tesis .....	11
Figura 4. Fases del desarrollo y sus correspondientes transiciones de fase .....	17
Figura 5. Mecanismo de biogénesis de miRNAs maduros .....	18
Figura 6. Secuencia de reconocimiento de <i>SPL9</i> por miR156.....	20
Figura 7. Esquema de la distribución temporal de factores represores y activadores implicados en procesos relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo.....	21
Figura 8. Comparación de los fenotipos de las plantas <i>spl9 spl15</i> , <i>35S::MIR156</i> y <i>35S::TEM1</i> .....	30
Figura 9. Esquema simplificado de las interacciones entre los distintos componentes de las rutas de regulación de la floración por la edad y la acción de los genes <i>TEMPRANILLO</i> .....	31
Figura 10. Análisis de posibles cajas de unión de SPL en los genes <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> .....	35
Figura 11. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> en plantas silvestres, <i>35S::MIR156</i> y <i>35S::MIM156</i> .....	38
Figura 12. Ensayo de tinción histoquímica de GUS en plantas <i>pTEM1::GUS 35S::MIR156</i> .....	39
Figura 13. Análisis de la acumulación de miR156 en plantas silvestres, <i>tem1 tem2</i> y <i>35S::TEM1</i> ..	40
Figura 14. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> , <i>RAV1</i> y <i>SOC1</i> en plantas silvestres, <i>pSPL9::rSPL9</i> , <i>spl9 spl15</i> y <i>35S::SPL3</i> .....	42
Figura 15. Niveles de mRNA de <i>SPL9</i> en plantas silvestres, <i>tem1 tem2</i> y sobre-expresantes de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> .....	43
Figura 16. Análisis de la unión de TEM1 a <i>SPL9</i> mediante ChIP-qPCR.....	44
Figura 17. Niveles de mRNA de los genes <i>CO/FT</i> y <i>TEM/RAV</i> en plantas silvestres y <i>35S::MIM172</i> .....	46
Figura 18. Figura 1. Acumulación de miR172 en plantas silvestres, <i>tem1 tem2</i> y <i>35S::TEM1</i> .....	46
Figura 19. Análisis de la unión de TEM1 y TEM2 a <i>MIR172C</i> mediante ChIP-qPCR.....	47
Figura 20. Fenotipo de los genotipos estudiados cultivados en condiciones de SD .....	50
Figura 21. Fenotipo de plantas Col-0, <i>tem1 tem2</i> y <i>35S::TEM1</i> a día 24 en condiciones de SD ....	55
Figura 22. Análisis de la velocidad de producción de hojas en condiciones de SD .....	56
Figura 23. Tiempo de floración del cruzamiento <i>tem1 35S::MIR156</i> y los respectivos parentales en condiciones de LD.....	58
Figura 24. Fenotipo de las plantas <i>tem1 35S::MIR156</i> y los respectivos parentales en condiciones de LD.....	58
Figura 25. Esquema de la regulación de los distintos componentes de la ruta de la edad por TEM1 y TEM2.....	63
Figura 26. La luz controla la localización subcelular de los fitocromos .....	82
Figura 27. La luz roja lejana induce la floración y otras respuestas de crecimiento en sombra.....	83
Figura 28. Modelo simplificado de la señalización de la ruta de la luz .....	85
Figura 29. Mecanismo de regulación de phyB sobre los factores PIF en condiciones de luz .....	86
Figura 30. Fenotipo de floración temprana de las plantas <i>35S::PIF5</i> .....	87
Figura 31. Fenotipo de floración tardía de los mutantes <i>voz</i> en LD .....	89
Figura 32. Fenotipo de floración temprana de los mutantes <i>syp</i> a 16°C y 23°C.....	93
Figura 33. Las altas temperaturas inducen la floración .....	94
Figura 34. La arquitectura de las plantas está modula por la temperatura ambiental.....	95
Figura 35. La baja temperatura ambiental suprime el efecto de floración temprana de los mutantes phyB.....	95
Figura 36. Fenotipo del mutante <i>phyB-9</i> en condiciones de LD y SD a 22°C .....	98
Figura 37. Tiempo de floración y niveles de mRNA de <i>FT</i> y <i>TEM/RAV1</i> en plantas mutantes <i>phyB</i> en LD .....	99
Figura 38. Tiempo de floración y niveles de mRNA de <i>FT</i> y <i>TEM/RAV1</i> en plantas mutantes <i>phyB</i> en SD .....	100
Figura 39. Niveles de mRNA de <i>FT</i> , <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> en mutantes de distintos fitocromos en SD .....	101
Figura 40. Niveles de mRNA de <i>CO</i> , <i>FT</i> , <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> en sombra simulada.....	102

Figura 41. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> en sombra simulada a lo largo del desarrollo .....	103
Figura 42. Niveles de mRNA de <i>FT</i> , <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> en plantas silvestres y mutantes <i>phyB</i> , en SD (primer experimento) .....	105
Figura 43. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> en plantas silvestres y mutantes <i>phyB</i> , en SD (segundo experimento) .....	106
Figura 44. Análisis de los niveles de mRNA de <i>FT</i> a lo largo del desarrollo en plantas silvestres y <i>phyB</i> , en SD .....	107
Figura 45. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> y <i>RAV1</i> a lo largo del desarrollo en plantas silvestres y <i>phyB</i> , en SD .....	108
Figura 46. Ensayo de tinción histoquímica de GUS en plantas <i>pTEM1::GUS</i> y <i>phyB pTEM1::GUS</i> a lo largo del desarrollo, en SD .....	109
Figura 47. Fenotipos de floración en plantas de 26 días cultivadas en SD a 22°C .....	110
Figura 48. Fenotipos de floración en plantas de 20 días cultivadas en LD a 22°C .....	112
Figura 49. Niveles de mRNA de <i>FT</i> en plantas mutantes y sobre-expresantes de PIF4 y PIF5. ....	114
Figura 50. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> en las plantas mutantes y sobre-expresantes de PIF4 y PIF5 .....	115
Figura 51. Niveles de mRNA de <i>FT</i> , <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> en las plantas <i>pifQ</i> .....	116
Figura 52. Fenotipo de las plantas <i>35S::PIF5</i> comparado con el doble mutante <i>tem1 tem2</i> .....	118
Figura 53. Esquema de la distribución de los fragmentos utilizados para el ensayo de Y1H en el promotor de <i>TEM1</i> .....	119
Figura 54. Fenotipo de los mutantes sencillos y doble mutante <i>voz1-1voz2-1</i> en SD a 22°C .....	123
Figura 55. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> en los mutantes <i>voz</i> en LD a 22°C .....	126
Figura 56. Fenotipo de floración a 16°C, 22°C o 27°C y fotoperiodos de LD o SD. ....	127
Figura 57. Niveles de mRNA de <i>CO</i> y <i>FT</i> en LD a 22°C y 16°C .....	128
Figura 58. Niveles de mRNA de los genes <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> a 16°C y 22°C .....	129
Figura 59. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> en plantas de 8 y 15 días a 22°C o 16°C .....	130
Figura 60. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> a lo largo del desarrollo a 16°C o 22°C .....	131
Figura 61. Expresión de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> comparada según la edad cronológica (12 días) o fisiológica (8 días y 16 días) a 22°C y 16°C .....	133
Figura 62. Niveles de mRNA de <i>RAV1</i> a lo largo de 24 horas a 16°C o 22°C .....	134
Figura 63. Niveles de mRNA de <i>SVP</i> en mutantes <i>tem1 tem2</i> a 22°C y 16°C .....	137
Figura 64. Análisis de los dominios MADS en los promotores de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> .....	138
Figura 65. Análisis de la unión de <i>SVP</i> a <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> mediante ChIP-qPCR a 23°C y 16°C .....	138
Figura 66. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i> en mutantes <i>svp</i> a 16°C y 22°C .....	139
Figura 67. Fenotipo de floración de los mutantes <i>tem</i> y <i>svp</i> en condiciones de LD a 22°C .....	140
Figura 68. Fenotipo de floración de los mutantes <i>tem</i> y <i>svp</i> en condiciones de LD a 16°C .....	142
Figura 69. Niveles de mRNA de <i>FT</i> y <i>TSF</i> a lo largo del desarrollo a 22°C y a 16°C .....	144
Figura 70. Niveles de mRNA de <i>FT</i> y <i>TSF</i> en plantas <i>tem1 tem2</i> a 16°C .....	144
Figura 71. Niveles de mRNA de <i>FT</i> en plantas <i>tem1 tem2</i> y <i>svp-41</i> a 22°C .....	145
Figura 72. Niveles de mRNA de <i>FT</i> en mutantes <i>svp</i> y <i>tem1 tem2</i> a 22°C y 16°C .....	145
Figura 73. Comparación de la expresión de <i>FT</i> en plantas <i>svp</i> y <i>tem1 tem2</i> a 16°C y 22°C .....	146
Figura 74. Niveles de mRNA de <i>CO</i> y <i>FT</i> a 22°C y 27°C en SD .....	147
Figura 75. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> a 22°C y 27°C en SD .....	148
Figura 76. Niveles de mRNA de <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> a lo largo del desarrollo a 22°C y 27°C en SD .....	149
Figura 77. Ensayo de tinción histoquímica de GUS en plantas <i>pTEM1::GUS</i> a 22°C y 27°C ....	150
Figura 78. Niveles de mRNA de <i>FT</i> a lo largo del desarrollo a 22°C y 27°C .....	151
Figura 79. Fenotipo de floración de mutantes <i>tem</i> y <i>35S::TEM1</i> a 22°C y 27°C .....	152
Figura 80. Fenotipos de floración del mutante <i>phyB</i> en LD a 22°C y 16°C .....	154
Figura 81. Niveles de mRNA de <i>FT</i> , <i>TEM</i> y <i>RAV</i> en plantas silvestres y <i>phyB</i> en LD a 22°C y 16°C .....	155
Figura 82. Niveles de mRNA de <i>FT</i> , <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> en plantas silvestres y <i>phyB</i> en SD a 22°C y 16°C .....	156
Figura 83. Fenotipo de plantas cultivadas en SD a 27°C durante 26 días .....	156
Figura 84. Tiempo de floración de <i>phyB</i> y <i>tem1tem2</i> en SD a 22°C y 27°C .....	157



Figura 85. Niveles de mRNA de <i>FT</i> y <i>GA3ox1</i> en <i>phyB</i> y <i>tem1 tem2</i> en SD a 27°C .....	158
Figura 86. Niveles de mRNA de <i>FT</i> , <i>TEM1</i> y <i>TEM2</i> en <i>phyB</i> a lo largo del desarrollo en SD a 27°C .....	158
Figura 87. Modelo de la red de regulación de genes implicados en la floración a 22°C y 16°C .	166
Figura 88. Modelo final de la interacción entre las rutas de luz y temperatura en el control de los genes <i>TEMPRANILLO</i> .....	169
Figura 89. Esquema de la formación de ramas silépticas y prolépticas .....	191
Figura 90. Esquema de la función de los genes parálogos PdFT1 y PdFT2 en <i>Populus deltoides</i> . .	194
Figura 91. Esquema de las distintas transiciones estacionales en el desarrollo de <i>Populus</i> .....	195
Figura 92. Modelo que resume la principales interacciones de TEM en las diferentes rutas en las que hemos trabajado .....	234
Figura 93. Proceso de transformación y cultivo para obtención de líneas transgénicas en <i>Populus tremula x tremuloides</i> .....	253
Figura 94. Alineamiento de las secuencias de los genes <i>RAV1</i> y <i>RAV2</i> de <i>Populus trichocarpa</i> .....	260
Figura 95. Escrutinio de los clones positivos obtenidos en el ensayo .....	262

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de miRNAs maduros generados de los distintos locus <i>MIR156</i> y <i>MIR157</i>	19
Tabla 2. Secuencias de los miRNAs maduros generados de los distintos locus <i>MIR172</i>	20
Tabla 3. Predicción de las posibles secuencias de unión de miRNAs a genes de la familia <i>RAV</i>	34
Tabla 4. Resumen de los posibles sitios de unión RAV en los genes <i>MIR156</i> , <i>SPL</i> y <i>MIR172</i>	36
Tabla 5. Análisis del tiempo de floración en condiciones de SD	49
Tabla 6. Análisis del tiempo de floración en condiciones de LD	51
Tabla 7. Análisis de juvenilidad en condiciones de SD	52
Tabla 8. Análisis de juvenilidad en condiciones de LD	53
Tabla 9. Análisis de la producción de la 1ª hoja adulta en condiciones de SD	54
Tabla 10. Resumen de cruzamientos realizados para establecer las interacciones génica	57
Tabla 11. Resumen de fenotipos	68
Tabla 12. Tiempo de floración de las combinaciones mutantes <i>phyB</i> , <i>tem1</i> y <i>tem2</i> , SD a 22°C	111
Tabla 13. Tiempo de floración de las combinaciones mutantes <i>phyB</i> , <i>tem1</i> y <i>tem2</i> , LD a 22°C	112
Tabla 14. Tiempo de floración de plantas mutantes y sobre-expresantes de PIFs, SD a 22°C	117
Tabla 15. Tiempo de floración de plantas mutantes y sobre-expresantes de PIFs, LD a 22°C	117
Tabla 16. Análisis <i>in silico</i> de los elementos localizados en los promotores de <i>TEM1</i> , <i>TEM2</i> y <i>RAV1</i>	120
Tabla 17. Proteínas obtenidas en el ensayo de híbrido sencillo en levadura (Y1H) realizado con dos regiones del promotor de <i>TEM1</i>	121
Tabla 18. Tiempo de floración de los mutantes <i>vaz</i> en LD a 22°C	123
Tabla 19. Tiempo de floración de los mutantes <i>vaz</i> en SD a 22°C	124
Tabla 20. Tiempo de floración de <i>35S::VOZ1</i> en LD a 22°C	124
Tabla 21. Tiempo de floración de <i>35S::VOZ1</i> en SD a 22°C	125
Tabla 22. Tiempo de floración de los mutantes <i>tem1</i> , <i>tem2</i> y <i>rav1</i> cultivados a 22°C o 16°C	133
Tabla 23. Tiempo de floración de los mutantes <i>tem1</i> , <i>tem2</i> y <i>svp-41</i> cultivados a 22°C o 16°C	135
Tabla 24. Tiempo de floración de las combinaciones del mutante <i>svp-41</i> con los mutantes <i>tem</i> en LD a 22°C	141
Tabla 25. Tiempo de floración de las combinaciones del mutante <i>svp-41</i> con los mutantes <i>tem</i> en LD a 16°C	142
Tabla 26. Tiempo de floración de los mutantes <i>tem1</i> , <i>tem2</i> y <i>tem1 tem2</i> a 22°C y 27°C en SD	153
Tabla 27. Información de genotipos, ecotipos, procedencia y referencia de las semillas utilizadas	240
Tabla 28. Construcciones realizadas	244
Tabla 29. Descripción de las concentraciones de los aminoácidos utilizados	245
Tabla 30. Descripción de las concentraciones de trabajo de los antibióticos y reactivos utilizados	245
Tabla 31. Condiciones estándar para amplificación de fragmentos de DNA por PCR	249
Tabla 32. Condiciones estándar para amplificación de fragmentos de DNA por PCR cuantitativa	255
Tabla 33. Lista de oligonucleótidos utilizados	264
Tabla 34. Lista de recursos bioinformáticos utilizados	266

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados	RNA	Ácido Ribonucléico
°N	Grados latitud Norte	RNAi	RNA de interferencia
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol	RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa
Amp <sup>R</sup>	Resistencia a Ampicilina	s	Segundos
ATP	Adenosina trifosfato	SAM	Meristemo floral del tallo
cDNA	DNA codificante	SD	Día Corto (Short Day)
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina	SDS	Dodecil-sulfato sódico
ChIP-qPCR	Inmunoprecipitación de cromatina seguida de PCR cuantitativa en tiempo real	Spec <sup>R</sup>	Resistencia a Spectomicina
cm	Centímetros	SSC	Citrato de sodio salino
Col-0	Ecotipo silvestre <i>Columbia-0</i>	T89	Ecotipo silvestre <i>Populus</i>
DNA	Ácido Deoxirribonucleico	T-DNA	DNA de transferencia
dNTPs	Desoxirribonucleótidos	TBE	Tris-Borato-EDTA
D.O.	Densidad Óptica	v/v	Volumen por volumen
Kb	Kilo bases	W	Watts
Fx	Generación filial "x"	Ws	Ecotipo silvestres <i>Wassilewskija</i>
g	Gramos	WT	Ecotipo silvestre genérico
GAs	Giberelinas	X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopiranosido
Gen	Gentamicina	UTR	Región no traducible
GFP	Proteína verde fluorescente		
GUS	β-glucoronidasa		
h	Horas		
H <sub>2</sub> O	Agua		
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactósido		
Kan <sup>R</sup>	Resistencia a Kanamicina		
L	Litro		
LB	Medio Luria-Bertani		
LD	Día largo (Long-Day)		
M	Molar		
mA	Miliamperios		
μl	Microlitros		
mg	Miligramos.		
min	Minutos.		
ml	Mililitros.		
mM	Milimolar		
mm	Milímetros		
μmol·m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup>	Micromol/metro/segundo		
MS	Medio Murashige y Skoog		
miRNA	Micro RNA		
mRNA	RNA mensajero		
N <sub>2</sub>	Nitrógeno		
nm	Nanómetros		
nt	Nucleótidos		
O/N	Over-night		
p	Promotor		
pb	Pares de bases		
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		
p/v	Peso/Volumen		
RB	Réplica biológica		
rpm	Revoluciones por minuto		



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

### **1. TRANSICIONES ENTRE FASES DE DESARROLLO EN LAS PLANTAS**

Las plantas pasan por una serie de fases de desarrollo durante su ciclo vital que están moduladas por señales ambientales y endógenas. Después de la germinación se inicia una fase de desarrollo en la que los brotes pasan por un período de crecimiento vegetativo durante el cual incrementan rápidamente su tamaño, su capacidad fotosintética y acumulan reservas. Durante esta fase juvenil, las plantas no tienen competencia para florecer; son insensibles a la inducción por factores ambientales como consecuencia de la regulación que ejercen los factores endógenos (revisado recientemente por Bergonzi & Albani, 2011; Huijser & Schmid, 2011). Con la transición a la fase adulta, las plantas alcanzan la competencia para responder a los inductores florales, requisito indispensable para la transición a la fase reproductiva. La regulación de la transición a la floración es un determinante clave para el éxito reproductivo de las plantas y juega un papel esencial en la adaptación de las plantas a las estaciones y a la geografía.

A efectos prácticos, entender cuándo y cómo ocurre el cambio de la fase juvenil a la adulta y de la fase vegetativa a la reproductiva es importante para la gestión de las cosechas en las especies con interés agronómico. Por ello se usan especies como el arroz, el tomate, la remolacha o la cebada como modelos de estudio de las rutas de control de la floración a partir de los conocimientos generados en *Arabidopsis thaliana*. En estas especies, una floración temprana puede conllevar una reducción en la biomasa y en el número de semillas fértiles de frutos; por el contrario, una prolongada etapa vegetativa podría dar lugar al incremento en la biomasa y afectar a la producción de las semillas. En el caso de los árboles, como en el modelo *Populus sp.*, resulta interesante incrementar su crecimiento vegetativo para aumentar así la producción de celulosa o para obtener más biomasa para la generación de bioenergía (Demura & Ye, 2010).

#### **1.1 Transición de la fase juvenil a la fase adulta durante el crecimiento vegetativo**

El crecimiento vegetativo se puede dividir en una fase juvenil y una fase adulta. En general, la duración de la fase juvenil difiere entre especies, desde un período de unos pocos días en las plantas herbáceas anuales (*Arabidopsis thaliana*), que tienen un crecimiento rápido y completan su ciclo vital en una estación de crecimiento, a largos períodos que pueden durar años en el caso de especies perennes (*Populus sp.*).

Desde el punto de vista morfológico, la transición de la fase juvenil a la adulta lleva asociadas algunas modificaciones fenotípicas, que pueden diferir entre especies pero que, en general, incluyen cambios en la morfología de la hoja (tamaño, forma, disposición y velocidad de producción); en el patrón de diferenciación de la epidermis (cambio en la distribución de

tricomas y tamaño celular); en la producción de raíces adventicias; en la elongación de los entrenudos o, la más evidente, en la capacidad para producir las estructuras reproductivas cuando la planta es competente para ello.

## **1.2 Transición de la fase vegetativa a la reproductiva: la transición floral**

Las especies anuales dedican toda su energía y recursos a maximizar el número de descendientes en un único evento reproductivo antes de morir. Por ello, es crítico el momento en que ha de iniciarse la floración, ya que ésta supone un fuerte impacto en su viabilidad y capacidad de supervivencia y reproducción. A lo largo de la evolución, este rasgo se ha modulado y ajustado para que se produzca en el momento en el que las condiciones climáticas son las más adecuadas para permitir el éxito del proceso, de manera que se optimicen la supervivencia y la dispersión de las semillas. Desde una perspectiva fisiológica, las plantas evitan la baja producción de semillas que ocurre si florecen prematuramente, mediante el mantenimiento de la fase juvenil y la maduración tardía, lo que permite un mayor crecimiento que conlleva una mayor fecundidad y una mayor calidad de la descendencia (revisado en Jones, 1999; Poethig, 2010).

Durante la transición floral, se producen una serie de cambios, al principio imperceptibles pero irreversibles, en el meristemo apical del tallo (SAM por las siglas en inglés de *shoot apical meristem*) asociados a la adquisición de la competencia reproductiva en las plantas adultas (Tooke et al., 2005) cuando éstas son capaces de responder a los estímulos inductores de la floración (Adrian et al., 2009; Amasino, 2010; Srikanth & Schmid, 2011).

En sentido amplio, hay dos tipos de información que las plantas usan para determinar este momento óptimo en el que iniciar la floración: señales ambientales y señales endógenas. Entre los factores ambientales que afectan al desarrollo de las plantas tenemos: (1) la duración relativa de las horas de día y de noche (conocida como fotoperiodo), (2) la intensidad y la calidad de la luz, ésta relacionada con la presencia o ausencia de plantas cercanas o la estación del año, y (3) la temperatura; entre otros factores, como la disponibilidad de agua o nutrientes. En definitiva, parámetros que las plantas detectan en el ambiente en el que crecen y que perciben principalmente en las hojas. En el segundo tipo de información encontramos señales internas (o autónomas), que actúan, en general, de manera independiente de los factores ambientales, y que son esenciales para controlar, por ejemplo, el estado de desarrollo de las plantas. Tradicionalmente, se ha considerado que hormonas (entre ellas las giberelinas, GAs) y carbohidratos (sacarosa) eran los principales reguladores en esta ruta (Corbesier et al., 1998; Moon et al., 2003; Ohto et al., 2001; Seo et al., 2011). Actualmente, se conocen más rutas de regulación endógenas, como la dependiente de la edad.

Para integrar la información que reciben, las plantas han desarrollado distintas rutas genéticas en respuesta a estos estímulos. La regulación genética de la transición floral es la base

fundamental de esta tesis, por ello, voy a profundizar aquí en algunas de las rutas genéticas que conforman su regulación.

## **2. RUTAS DE CONTROL DE LA FLORACIÓN**

Las rutas genéticas que perciben y responden a las señales ambientales y endógenas para controlar cuándo debe producirse la floración, conforman una compleja red génica que integra dicha información y modula la acción de una serie de genes para disparar o reprimir la floración (Amasino, 2010).

Una de las rutas mejor estudiadas es la denominada ruta del fotoperiodo, que promueve la floración por exposición a fotoperiodos inductivos, en el caso de *Arabidopsis* en días largos (LD en adelante, por las siglas del inglés *long days*). Otro importante factor ambiental que perciben las plantas y regula a diferentes genes es la temperatura. En este caso, podríamos hablar de dos rutas, ya que podemos separar la respuesta a periodos prolongados de frío (y hablaríamos de vernalización) y la respuesta a temperaturas moderadas. Tradicionalmente, las rutas del fotoperiodo y la vernalización han sido las más estudiadas entre las que responden al ambiente, por lo que se dispone de abundante información sobre los genes implicados en ellas (Andrés & Coupland, 2012; Srikanth & Schmid, 2011).

Existe además una regulación autónoma o endógena de la floración independiente de la señalización ambiental. Una de estas rutas está relacionada con la edad de la planta, y está regulada por la acción de dos microRNAs (miRNAs; revisado en Poethig, 2010).

De forma sintética, todas estas rutas se componen de una serie de genes que inducen la floración y de otros que la reprimen; la actuación de unos u otros depende de la combinación de estos factores ambientales y endógenos. La hipótesis del control multifactorial de la floración, revisada por Bernier (1988), proponía que una serie de inductores y represores, que incluyen hormonas y productos resultantes de la fotosíntesis, eran los responsables del cambio de la fase vegetativa a la reproductiva. Acorde con esta teoría, la iniciación floral sólo podría ser disparada cuando los factores limitantes están presentes en el SAM, en el momento y en la dosis adecuadas (Bernier, 1988). Estos factores limitantes podrían ser las sustancias denominadas "florigenas", concepto que ha cumplido más de 70 años (Chailakhyan, 1937; revisado recientemente por Matsoukas et al., 2012), y que postula la existencia de una señal (o señales) que se produce en la hoja y que tiene la capacidad de moverse a lo largo del sistema vascular hasta el SAM para promover ahí la floración. Se ha demostrado que una de esas señales (pero no la única) es la proteína FLOWERING LOCUS T (FT) que es un potente inductor de la floración (revisado en Matsoukas et al., 2012) cuya expresión está activada por el factor de transcripción CONSTANS (CO) (Putterill et al., 1995; Samach et al., 2000) en LD (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999).

Las rutas de control de la floración actúan de forma interdependiente, es decir, sus componentes son regulados por diferentes señales procedentes de diferentes rutas. Por ello,

debido a la complejidad del sistema, cada vez más se habla de redes génicas de regulación. Esta interconexión y los mecanismos y componentes compartidos por diferentes especies nos indican su conservación e importancia evolutiva.

A continuación se resumirán los puntos más importantes de las rutas en las que he trabajado a lo largo de esta tesis.

## **2.1 Factores endógenos: miRNAs**

Los miRNAs son RNAs pequeños que no se traducen y que silencian genes que en muchos casos codifican factores de transcripción por complementariedad de secuencias (revisado en Voinnet, 2009). Se ha descrito el papel de los miRNAs miR156 y miR172 en la regulación de procesos de desarrollo como son las transiciones de la fase juvenil a la adulta y de la fase vegetativa a la reproductiva (revisado en Huijser & Schmid, 2011). Este papel en el control de estas transiciones funciona con relativa independencia de los factores ambientales, por lo que se consideran reguladores endógenos de la floración.

El miRNA miR156 mantiene la fase juvenil y retrasa la transición a la fase adulta y con ello, indirectamente, la floración (Wu & Poethig, 2006; Wu et al., 2009). Se ha demostrado que la transición de la fase juvenil a la adulta está acompañada de un descenso en la abundancia de miR156, a la vez que se observa un incremento en la abundancia de sus mRNAs diana, que codifican varios factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL), y de otro miRNA, miR172, durante el desarrollo de la fase adulta (revisado recientemente en Huijser & Schmid, 2011). La expresión de miR172 promueve indirectamente (y con independencia de CO) la activación de *FT* en las hojas, en respuesta a *GIGANTEA* (*G*) (Jung et al., 2007), un gen regulado por el reloj circadiano y que promueve la floración en LD (S. Fowler et al., 1999). En este caso, miR172 silencia a varios factores de transcripción de la familia APETALA2 (AP2-like) (Jung et al., 2007; Mathieu et al., 2009), que a su vez son represores de *FT* (Aukerman & Sakai, 2003). Además, el incremento de la expresión en el SAM de los SPL activa la transcripción de genes de identidad del meristemo floral (Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009), los cuales activan posteriormente a los genes de identidad de órgano floral (revisado en Causier et al., 2010). Por lo tanto, se considera que los genes *SPL* y *MIR172* son promotores de la floración.

El capítulo 1 aborda en detalle la regulación de las fases de las transiciones entre las distintas fases del desarrollo, mediada por el módulo miR156/SPL/miR172.

## **2.2 Factores ambientales: luz y temperatura**

*Arabidopsis thaliana* es una planta facultativa de día largo. Es decir, que aunque puede florecer en día corto (8 h luz/16 h oscuridad; SD, del inglés, *short days*), lo hace mucho más rápido cuando dispone de más horas de luz (16 h luz/8 h oscuridad; LD). Esta respuesta fisiológica de las plantas a la duración relativa del día y la noche se conoce como respuesta



fotoperiódica, y permite a las plantas adaptarse a los cambios en su ambiente derivados de las estaciones (Thomas & Vince-Prue, 1997). Así, el acortamiento de los días prepara a las plantas para una bajada de temperatura asociada a la llegada del otoño. Esta regulación estacional nos indica que debe existir una integración de las señales lumínicas y térmicas que perciben las plantas.

La luz es un factor esencial para el desarrollo de las plantas. Tanto la duración relativa del día y de la noche (fotoperiodo) como la intensidad y la calidad de la luz (longitud de onda) determinan numerosas respuestas de las plantas al ambiente, y son percibidas en las hojas. La forma en que las plantas captan estas señales lumínicas está mediada por los fotorreceptores, que perciben de forma específica una longitud de onda determinada. Entre los más ampliamente estudiados se encuentran los fitocromos (phyA-phyE), que absorben luz roja y luz roja lejana, y los criptocromos (cry1, cry2) que absorben luz azul. En conjunto, los fitocromos y criptocromos regulan el crecimiento y el desarrollo en respuesta al fotoperiodo y a la calidad de la luz que reciben (revisado ampliamente en Kami et al., 2010).

El momento de inicio de la floración también está controlado por la temperatura a la que crecen las plantas; así las altas temperaturas promueven la floración (Balasubramanian et al., 2006; Kumar et al., 2012), mientras que las bajas temperaturas son capaces de retrasarla (Blázquez et al., 2003; Strasser et al., 2009). Los mecanismos de percepción y transducción de las señales de la temperatura siguen siendo poco conocidos, aunque se sabe que existe un control genético (Blázquez et al., 2003) y un control epigenético (Kumar & Wigge, 2010).

Para entender mejor estas respuestas a la luz y la temperatura, y para simplificar su complejidad, se presentarán de forma separada ambas rutas en el capítulo 2 de esta tesis.

### **2.2.1 Regulación por la luz**

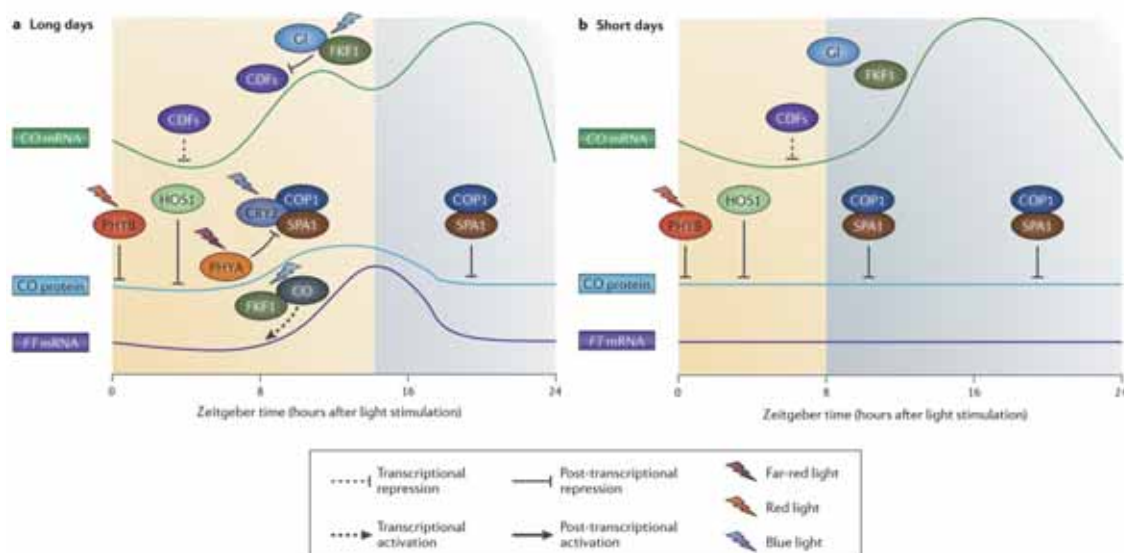
- **Ruta del fotoperiodo: módulo CO/FT en LD**

La información que reciben de estas señales lumínicas permite a las plantas medir la duración del día; para ello se requiere un oscilador circadiano (que constituye un mecanismo de control del ritmo interno), sensible a la señal externa captada por los fotorreceptores. En condiciones inductivas para *Arabidopsis* y otras especies de LD, coinciden un elevado número de horas de luz (señal externa) con el pico de expresión de una molécula controlada por el reloj circadiano (ritmo interno). La coincidencia de ambos factores es la señal que permite a la planta reconocer que está creciendo en condiciones favorables, y promover así la floración. En cambio, en condiciones no inductivas no se produce esta coincidencia y la floración no se inicia. A este mecanismo se le conoce como modelo de coincidencia externa (revisado en Yanovsky & Kay, 2003).

La molécula que está regulada por la señal lumínica externa y por el reloj circadiano es el factor de transcripción CO (Suárez-López et al., 2001; Valverde et al., 2004; Yanovsky & Kay, 2002), la activación del cual depende de dos componentes del reloj circadiano: *GI* y *FLAVIN*-

*BINDING KELCH F-BOX 1 (FKF1)* (revisado en de Montaigu et al., 2010). En condiciones inductoras de LD, la interacción al final del día entre GI y FKF1 induce la degradación de represores transcripcionales de *CO*, promoviendo su expresión (Sawa et al., 2007). De esta manera, sólo cuando el pico de expresión de *CO* coincide con el periodo de luz al final del día, la proteína CO es capaz de acumularse. Su estabilización y su degradación implica la actividad de los fotorreceptores phyA/cry2 y phyB, respectivamente (revisado en Valverde, 2011). Por un lado, phyA y cry2 mantienen la proteína CO estable durante las horas finales del día y, por otro, phyB promueve su degradación en las primeras horas del día. Por tanto, phyA y phyB restringen, cada uno en un sentido, la actividad de la proteína CO a un momento determinado del día, habilitándola para activar la transcripción de *FT* al final del día y promover la inducción floral.

En cambio, en condiciones de fotoperiodo no inductivo (SD), la proteína CO no es estable. El complejo GI/FKF1 no es funcional, de manera que no puede degradar a los represores transcripcionales de *CO* al final del día. Además, phyB desestabiliza a la proteína CO durante la mañana. Como resultado, *CO* sólo se expresa por la noche, momento en el que la proteína, al igual que en LD, no puede estabilizarse debido a la actividad del complejo COP1-SPA (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1/SUPPRESSOR OF PHYA-105) en la oscuridad. Por lo tanto, *FT* no puede ser inducido por CO y la floración no se acelera a través de la ruta del fotoperiodo. La compleja regulación transcripcional y post-transcripcional de CO (Fig. 1) asegura que éste sólo pueda activar la transcripción de *FT* en el tejido vascular de la hoja en LD y no en SD (revisado recientemente en Andrés & Coupland, 2012).



**Figura 1. Modelo de la regulación transcripcional y post-transcripcional de la proteína CONSTANS**

En LD, el pico de mRNA de *CO* ocurre entre 12 y 16 horas después del inicio del periodo de luz y es regulado por el componente del reloj circadiano GI en interacción con FKF1. Esta interacción estabiliza a FKF1 y promueve la degradación de los factores CDFs, que reprimen la transcripción de *CO*. La inhibición del complejo COP1-SPA1, mediada por phyA y CRY2, durante el día no permite la

acumulación de la proteína CO durante las horas de luz, pero sí su estabilización al final del día; posteriormente, durante las horas de oscuridad ese mismo complejo degrada de nuevo la proteína CO. Además, existe un mecanismo de regulación por phyB, que degrada de forma independiente de COP1 a la proteína CO durante las horas iniciales del día. Esta regulación transcripcional y post-transcripcional permite que se produzca un pico de la proteína CO al final del día, cuando ésta activará la transcripción de *FT*. En SD, el mecanismo de degradación de los represores transcripcionales CDF por el complejo GI/FKF1 no es funcional, de manera que se produce la represión transcripcional de CO durante todo el periodo de luz. En estas condiciones, la proteína CO es degradada por la actividad de phyB y del complejo COP1-SPA, los cuales evitan su acumulación y funcionalidad para activar a *FT*. Extraído de Andrés & Coupland (2012).

Además, CO sólo puede inducir la floración cuando se expresa en las células acompañantes del floema o en las venas menores de las hojas maduras, pero no en el SAM (An et al., 2004; Ayre & Turgeon, 2004); y su patrón de expresión es consistente con el modelo de coincidencia externa citado anteriormente.

Recientemente, se ha descrito una vía alternativa de activación de *FT* a través de GI, en ausencia de CO o en SD. En este caso, GI podría actuar evitando el acceso de los represores al promotor de *FT* o bien, afectando a la estabilidad de éstos (Sawa & Kay, 2011). Además de *FT*, se considera que su parálogo TWIN SISTER OF FT (*TSF*) también forma parte del estímulo floral. En condiciones inductivas, CO es capaz de activar a *FT* en la hoja (An et al., 2004; Corbesier et al., 2007; Jaeger & Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007) y a *TSF* en el ápice del tallo (Michaels et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005), y parece que ambas proteínas son capaces de viajar a través del sistema vascular hasta el SAM (Yamaguchi et al., 2005). La idea más aceptada es que es la proteína *FT* la que, desde las células acompañantes del floema, llega al SAM, donde es funcional.

Una vez en el SAM, las proteínas *FT* y *TSF* interactúan con el factor de transcripción FLOWERING LOCUS D (*FD*) (Abe et al., 2005; Jang et al., 2009; Wigge et al., 2005; Yamaguchi et al., 2005). Juntos, *FT*/*FD* o *TSF*/*FD* activan la expresión de *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) (Wigge et al., 2005) produciendo un cambio en el meristemo apical, que pasa de vegetativo (produce hojas) a inflorescente (produce los meristemas florales). *FT*/*FD* y *SOC1* activan en los lados del meristemo a los genes de identidad del meristemo floral, *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*), *FRUITFULL* (*FUL*) y *AGAMOUS LIKE 24* (*AGL24*), que son los que promueven el cambio de identidad del meristemo inflorescente a meristemo floral, lo que dará lugar finalmente a las flores (revisado en Liu et al., 2009).

- **Ruta de las hormonas giberelinas en SD**

Como planta facultativa de LD, *Arabidopsis* florece temprano en condiciones de fotoperiodo favorable, pero también es capaz de disparar la floración en condiciones no inductivas de SD. En SD, la expresión de *FT* es muy reducida, ya que el pico de expresión de su activador no coincide con las horas de luz, por lo que la proteína CO no es estable y se degrada (Suárez-López et al., 2001; Valverde et al., 2004; Wigge et al., 2005). En estas

condiciones no inductivas, son las hormonas GAs las que asumen el importante papel de inducir la floración (revisado en Mutasa-Göttgens & Hedden, 2009). De esta manera, las plantas aseguran su reproducción al activar la floración incluso en condiciones ambientales menos favorables (Wilson et al., 1992).

Las giberelinas se producen en la hoja y probablemente viajan hasta el SAM, donde se acumula su forma bioactiva (GA<sub>4</sub>) (Eriksson et al., 2006). De la misma manera que se considera a FT el “florigeno” principal en LD, las GAs lo serían en SD, ya que su acumulación en el SAM promueve la inducción de *SOC1*, *LFY* y *FT* (Blázquez & Weigel, 2000; Moon et al., 2003; Porri et al., 2012).

La ruta de señalización de las GAs, que incluye su biosíntesis, recambio y señalización, está fuertemente regulada por señales endógenas del desarrollo (revisado en Yamaguchi, 2008). En la ruta biosintética de la forma activa GA<sub>4</sub>, los dos enzimas que catalizan los pasos finales de la biosíntesis, la GA20-oxidasa (*GA20ox*) y la GA3-oxidasa (*GA3ox*), son clave en la regulación de la ruta (revisado en Hedden & Phillips, 2000). Centrándonos en los genes que codifican la enzima GA3ox, responsable de convertir el precursor de las GAs en su forma activa, encontramos una familia multigénica, consistente en al menos cuatro miembros, designados como *GA3ox1* a *GA3ox4*. Poco a poco se va conociendo más sobre cómo cada uno de ellos contribuye a optimizar los niveles de GAs bioactivas durante el crecimiento y el desarrollo. En concreto, las formas *GA3ox1* y *GA3ox2* son responsables de la producción de GAs durante la transición floral (Mitchum et al., 2006).

## **2.2.2 Ruta de la temperatura ambiental**

La temperatura es otra de las señales importantes que las plantas usan para determinar el momento de la inducción floral. Ésta afecta a las plantas de dos formas: (1) las bajas temperaturas (0-4°C) son necesarias para las plantas que requieren de un periodo de frío para florecer la siguiente temporada favorable (también algunos ecotipos de *Arabidopsis*, aunque no es necesario en el caso del ecotipo Col-0), y (2) las temperaturas moderadas (16°C/27°C) que experimentan a lo largo de su desarrollo también regulan la respuesta a la floración.

En la respuesta a la vernalización actúan, entre otros, los genes *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) y *FRIGIDA* (*FRI*) (revisado He, 2012), mientras que a temperatura moderadamente bajas (16°C) o altas (27°C/28°C) los principales represores son los genes *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), *FLOWERING LOCUS M* (*FLM*), además de la regulación epigenética mediada por los nucleosomas H2A.Z (revisado recientemente en Wigge, 2013).

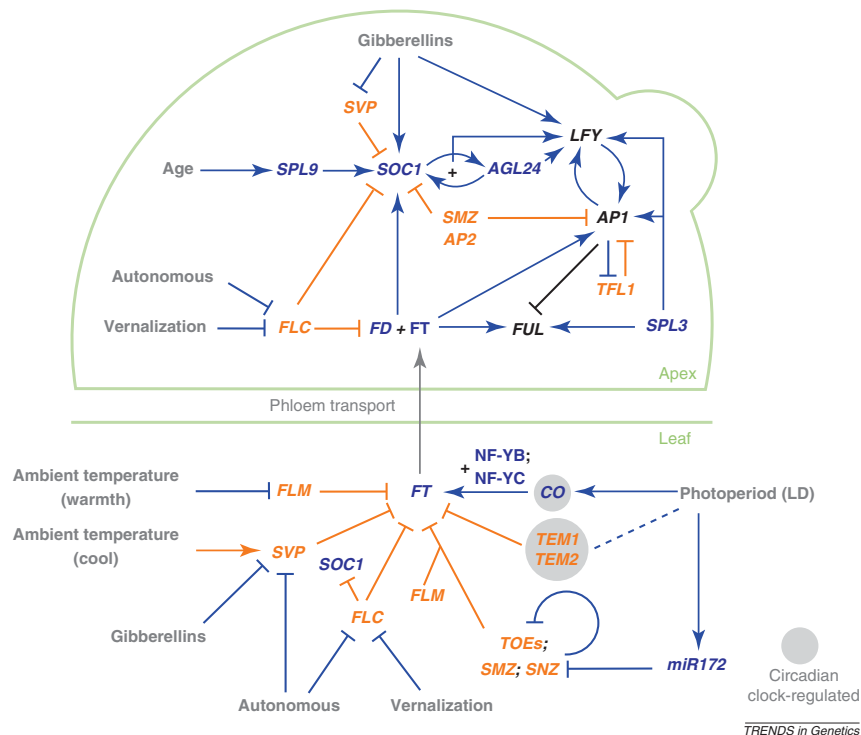
Las temperaturas moderadamente bajas (16°C) combinadas con condiciones inductivas (LD), retrasan la floración como consecuencia de una baja expresión de *FT* (Blázquez et al., 2003). En estas condiciones, *SVP* se une a los promotores de *FT* y *SOC1* (J. H. Lee et al., 2007) y reprime su transcripción. En cambio, las temperaturas moderadamente altas (27°C) combinadas con condiciones de fotoperiodo no inductivo (SD), promueven la floración a

través de la activación de *FT* (Balasubramanian et al., 2006) por una vía independiente de CO en el que está implicado PIF4 (Kumar et al., 2012).

### 3. INTERACCIÓN ENTRE LAS DISTINTAS RUTAS

La acción final de todas las rutas es controlar la expresión de un pequeño número de genes, los llamados integradores florales, que incluyen a *FT* (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999), *TSF* (Yamaguchi et al., 2005) y *SOC1* (Yoo et al., 2005). La importancia de estos genes radica en su papel como integradores de las diferentes señales ambientales y endógenas que la planta percibe como consecuencia del ambiente en el que se desarrolla y de acuerdo a su estado de desarrollo. Su función es la de activar a los genes de identidad del meristemo floral, *LEAFY* (*LFY*) (Lee et al., 2008), *FRUITFUL* (*FUL*) (Melzer et al., 2008) y *APETALA1* (*AP1*) (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005), los cuales activarán a su vez, a los genes implicados en la identidad del órgano floral, lo que dará finalmente lugar a las flores.

En *FT* convergen señales procedentes de distintas rutas ambientales y endógenas, como son el fotoperiodo, la temperatura, las hormonas GA o el efecto de los miRNA. En el SAM, es *SOC1*, uno de los promotores florales que se activa más pronto, quien también es capaz de integrar las señales que le llegan de las hormonas GAs, el efecto de los miRNAs o el efecto de la temperatura (Lee & Lee, 2010; Wellmer & Riechmann, 2010). La apropiada relación del conjunto de todas esas señales, en el tiempo y en el espacio, es lo que determinará finalmente la floración (Fig. 2).



**Figura 2. Esquema de las diferentes rutas genéticas que regulan la floración en *Arabidopsis***

Se muestran las interacciones entre las diferentes rutas y genes implicados en el control de los integradores florales, *FT* y *SOC1*, y su localización espacial, en hoja o meristemo apical (apex). Algunos de estos genes han sido descritos en esta introducción y serán tratados en profundidad a lo largo de esta tesis. Extraído de Wellmer & Riechmann, 2010.

#### **4. LA IMPORTANCIA DE LOS REPRESORES DURANTE EL DESARROLLO**

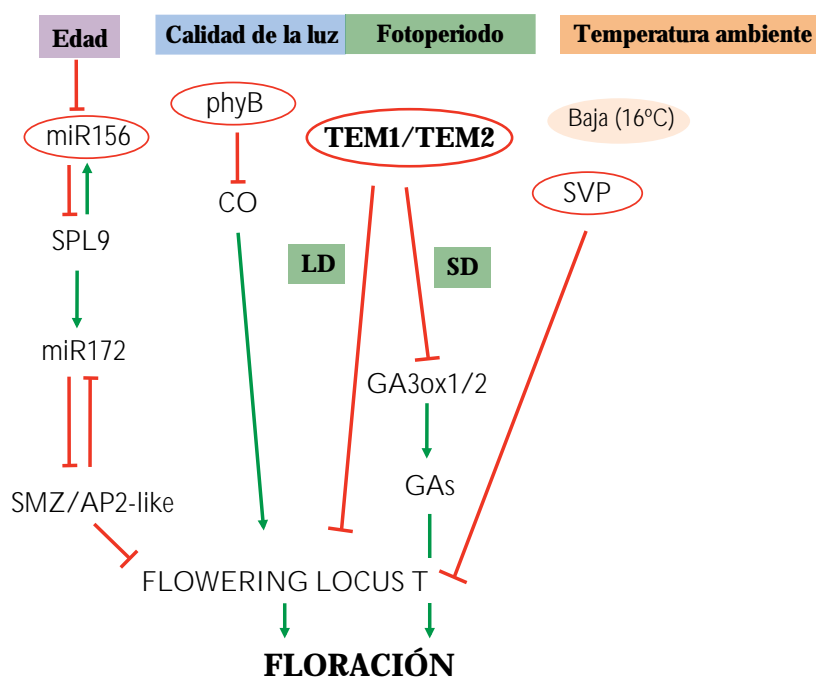
La idea de una señal o señales o sustancias “florígenas”, es decir, señales móviles que sintetizadas en la hoja viajan a través del floema hasta el ápice del tallo para promover la floración, lleva asociada la pregunta de si existen también sustancias “antiflorígenas”. La detección de señales antagonistas que promueven el efecto contrario, el retraso de la floración, podría ser la respuesta. Aunque todavía no se han identificado moléculas móviles que actúen como represores de la floración, y por tanto no se ha identificado ninguna como “antiflorígeno”, se han caracterizado muchas proteínas que reprimen la floración. Una amplia descripción de activadores y represores puede encontrarse en las recientes revisiones de (Matsoukas et al., 2012; Srikanth & Schmid, 2011; Yant et al., 2009).

Los represores florales son esenciales para evitar la activación prematura de los genes que promueven la floración, fundamentalmente *FT* y *SOC1*, asegurando la correcta duración de la fase juvenil, permitiendo la transición a la fase reproductiva en condiciones óptimas para asegurar el éxito reproductivo. Estos actúan directamente por medio de elementos *cis*-reguladores, controlando la represión transcripcional, o bien mediante remodelación de la cromatina (revisado en Farrona et al., 2008). Durante la fase juvenil y la adulta pre-inductiva los represores mantienen el SAM en estado vegetativo. Cuando la señalización autónoma coincide con unas condiciones ambientales adecuadas, se supera esta represión y se dispara el proceso irreversible de inducción floral.

En las últimas décadas cada vez más mecanismos de represión de la floración están saliendo a la luz. Por ejemplo, se ha caracterizado un represor floral dentro de la familia génica de *FT*, *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*. Estudios de interacción proteica indican que *FT* y *TFL1* compiten en el meristemo por la modulación de la actividad de *FD* (Ahn et al., 2006). Además, *TFL1* actúa controlando el desarrollo de la inflorescencia regulando la expresión de *AP1* y *LFY* (Ratcliffe et al., 1999). Otros represores ampliamente caracterizados pertenecen a la familia de los genes *MADS box*, como son los citados anteriormente, *SVP*, *FLC* y *FLM*. Los cuales parecen formar heterodímeros e interactuar a nivel de proteína (Lee et al., 2007; Li et al., 2008; Scortecci et al., 2003) para regular la expresión de *FT*, *FD* y *SOC1* en distintas condiciones de temperatura (Balasubramanian et al., 2006; Lee et al., 2007; Scortecci et al., 2001). Otro grupo de represores que están implicados en la represión directa de *FT* en las hojas, es el grupo de proteínas que contienen uno o más dominios de unión a DNA del tipo AP2. Este grupo, lo podemos dividir en dos sub-grupos: (1) proteínas con un único dominio AP2 y (2) proteínas con dos dominios AP2. En el primer grupo, encontramos a los genes de la familia de factores de transcripción *RAV*, a la que pertenecen los genes *TEMPRANILLO (TEM1 y TEM2)*. En el segundo grupo, encontramos al gen *APETALA2 (AP2)*, que da

nombre al grupo, así como otros cinco factores de transcripción que se caracterizan por tener dos dominios de unión a DNA del tipo AP2, además de tener un sitio de reconocimiento para el miRNA miR172 (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004). Los otros 5 miembros de la familia (los genes *AP2-like*) son *TARGET OF EAT 1-3 (TOE1-TOE3)*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* y *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* (Schmid et al., 2003). Con la excepción de TOE3, todos ellos reprimen la floración. Además, parece existir una redundancia funcional entre ellos (Aukerman & Sakai, 2003).

La figura 3 muestra un esquema muy simplificado de las rutas de regulación de la floración, en las que hemos trabajado a lo largo de esta tesis. Además se han destacado algunos de los represores que vamos a presentar en detalle en los siguientes capítulos.



**Figura 3. Esquema de las rutas y genes con los que hemos trabajado a lo largo de esta tesis**

Se muestran de forma simplificada las tres rutas reguladoras de la floración en las que hemos trabajado y que se van a detallar en los capítulos 1 y 2. Se han destacado algunos de los represores florales (círculos) en los que hemos centrado nuestro estudio (miR156, phyB, SVP y los genes TEM), así como dos de las moléculas inductoras de la floración, *FT* y las hormonas GAs, responsables de la floración en condiciones de LD y SD, respectivamente. Las flechas indican regulación positiva o activación y las líneas acabadas en barra indican regulación negativa o represión.

## 5. LOS GENES *TEMPRANILLO* Y *RAV1*

Los genes *TEMPRANILLO (TEM1 y TEM2)*, miembros de la familia de factores de transcripción *RAV* (Related to *ABI3/VP1*), presentan un dominio AP2/ERF y un dominio B3 de unión al DNA. Esta familia está formada por seis miembros: *RAV1*, *RAV1-like*, *RAV2 (TEM2)*, *RAV2-like (TEM1)*, *RAV3* y *RAV3-like* (Riechmann & Meyerowitz, 1998).

Los primeros estudios realizados sobre *RAV1* han aportado información sobre la secuencia

de reconocimiento al DNA de estos factores de transcripción (Kagaya et al, 1999), además de permitir la identificación de un dominio represor presente en cuatro de los seis miembros de la familia (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009).

### TEMPRANILLO

Caracterizados en nuestro laboratorio, los genes *TEM* actúan como represores en dos rutas de control de la floración: la ruta del fotoperiodo (en condiciones de LD) y la ruta de las giberelinas (en condiciones de SD), reprimiendo directamente a *FT* (Castillejo & Pelaz, 2008) y a los genes de la síntesis de las GAs *GA3ox1/2* (Osnato et al., 2012), respectivamente. De esta manera, integran la regulación de dos de las rutas más importantes de la inducción floral, determinando cuándo debe desencadenarse la floración tanto en día largo como en día corto.

En LD, se ha comprobado que *TEM1* se une a la región 5'UTR del promotor de *FT*, evitando, aún en presencia de su activador CO, que éste se active y promueva una floración temprana. El análisis de expresión de *FT* en plantas mutantes y sobre-expresantes de TEM, han confirmado que éste presenta una expresión alterada respecto a las plantas silvestres; las plantas mutantes muestran mayores niveles de *FT*, lo que se correlaciona con un adelanto de la floración, mientras que las sobre-expresantes muestran niveles indetectables de *FT* en estricta relación con el tiempo de floración extremadamente tardío de estas plantas. Además, *TEM1* y *TEM2* presentan elevados niveles de expresión en etapas tempranas del desarrollo que van decreciendo a lo largo del desarrollo de la planta, mostrando de esta manera una relación opuesta al incremento paulatino en la expresión de *FT*. Estos datos sugieren que la bajada de niveles de *TEM* es necesaria para el incremento de expresión de *FT*, sin que los valores de su activador CO varíen sustancialmente. Estos datos, junto con los datos genéticos obtenidos han permitido determinar que es el balance entre el activador (*CO*) y los represores (*TEM*), el responsable de la acumulación de *FT* en condiciones de fotoperiodo favorable. Además, al igual que CO, los genes *TEM* también están regulados por el reloj circadiano, mostrando un pico de expresión durante la noche. El uso de plantas transgénicas (de silenciamiento o sobre-expresión) y de mutantes ha permitido demostrar la existencia de redundancia funcional entre ambos genes (Castillejo & Pelaz, 2008, Osnato et al., 2012).

En condiciones de SD, se ha comprobado que *TEM1* es capaz de unirse al primer exón de los genes *GA3ox1* y *GA3ox2*, responsables de la producción de la forma activa de las giberelinas ( $GA_4$ ). La producción de GAs en condiciones de SD es esencial para asegurar la floración. De esta manera, los genes *TEM* regulan de forma directa a los enzimas que catalizan el paso final de su biosíntesis, evitando de esta manera su generación y acumulación. En plantas mutantes y sobre-expresantes de *TEM*, se altera la expresión de los genes *GA3OX1/2*, lo que provoca un adelanto o retraso de la floración, respectivamente.

Tanto *TEM1* como *TEM2* funcionan como represores en la hoja; sin embargo su patrón de expresión es más generalizado. La inactivación de *TEM1* exclusivamente en el SAM da lugar



a una floración temprana, lo que indica que TEM1 también tiene un papel represor de la floración en el meristemo apical (Osnato et al., 2012).

### RAV1

*RAV1* es el gen de la familia RAV más próximo en homología de secuencia a *TEM1* y *TEM2*. Todos los miembros de la familia de factores de transcripción RAV comparten la característica estructura de dos dominios, un AP2 y un B3, que fue inicialmente descrita en *RAV1* (Kagaya et al., 1999). También comparte con el resto de miembros más cercanos (*TEM1*, *TEM2* y *RAV1-like*) un dominio en C-terminal (cuyo motivo es RLFGV) el cual exhibe una actividad represora (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009). *RAV1* ha sido descrito como un regulador positivo de la senescencia de las hojas (Woo et al., 2010); parece ser regulado negativamente por brasinoesteroides (una hormona vegetal que promueve la expansión y la división celular, y con ello el crecimiento de los órganos) (Hu et al., 2004) y regulado positivamente por sequía, estrés salino y estrés biótico (Sohn et al., 2006), además de por frío (Fowler & Thomashow, 2002). En relación con la temperatura, *RAV1* ha sido descrito como un gen que actúa en respuesta al frío continuado (0-4°C), al ser rápidamente inducido en respuesta a bajas temperaturas en paralelo a *CBF2* (proteína del tipo DREB1) y *ZAT12* (Fowler & Thomashow, 2002), las cuales contribuyen a incrementar la tolerancia al frío. Además, *ZAT12* y *RAV1* actúan conjuntamente y en paralelo a la ruta de los genes *CBF1-3* (Fowler et al., 2005). No se ha descrito que *RAV1* intervenga en la respuesta a las bajas temperaturas moderadas de 16°C, por lo que hemos considerado interesante su estudio en estas condiciones, al igual que para el resto de miembros de la familia *RAV*, los genes *TEM1* y *TEM2*.

## **6. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA FLORACIÓN EN OTRA PLANTA MODELO: *POPULUS SP***

Mecanismos similares a los anteriormente citados en *Arabidopsis*, son utilizados por otras especies para monitorizar las condiciones ambientales y adaptarse a los cambios estacionales. Así, las plantas perennes que crecen en zonas templadas del planeta pueden adaptarse y sobrevivir a los cambios de duración del fotoperiodo y temperatura.

El género *Populus* es la planta modelo utilizada en los estudios con especies perennes. En climas templados, las especies de *Populus* florecen durante la primavera, cuando el fotoperiodo es más largo y las temperaturas incrementan. Durante el verano, las yemas florales formadas el año anterior se desarrollan rápidamente, mientras que la llegada de condiciones otoñales, con días cada vez más cortos y fríos, inducen la parada estacional de crecimiento y a la formación de yemas terminales. Seguidamente, prosigue la entrada en dormancia de las yemas como medida de protección frente al frío invernal. La percepción del fotoperiodo es esencial para determinar el inicio de la parada estacional de crecimiento y la formación de las yemas. Este

rasgo es adaptativo y está regulado por un estricto control genético (revisado en Jansson & Douglas, 2007).

Todas estas señales ambientales, junto con señales endógenas determinan los procesos de desarrollo de las plantas. A diferencia de las especies anuales, las especies perennes tienen una fase juvenil que puede durar varios años, por lo que año a año han de adaptarse a los cambios estacionales, además de asegurar la continuidad de este periodo de crecimiento vegetativo antes de iniciar la transición floral.

En los últimos años se han dado a conocer algunos de los mecanismos que usan las plantas perennes para percibir los cambios ambientales, así como los mecanismos endógenos que son responsables de controlar las transiciones de fase.

Como en *Arabidopsis*, el módulo CO/FT de *Populus* juega un importante papel regulador en el control de la floración, además de controlar la parada de crecimiento estacional y la formación de las yemas. Böhlenius y colaboradores describieron cómo el pico de expresión de *PtCO* al final del día determina, al igual que en *Arabidopsis*, que pueda o no activar a *PtFT1*. La activación de *FT1* coincide con una larga duración de fotoperiodo, mientras que la no activación, se produce cuando *PtCO* pica en oscuridad, coincidiendo con un fotoperiodo más corto. En estas condiciones de fotoperiodo corto, se dispara la respuesta de parada estacional, que inducirá la formación de las yemas (Böhlenius et al., 2006).

En *Populus* se han descrito dos genes homólogos al *FT* de *Arabidopsis*, son los genes *PtFT1* (Böhlenius et al., 2006) y *PtFT2* (Hsu et al., 2006). Además, se ha descrito muy recientemente la implicación del gen *RAV1* homólogo de *Castanea sativa* (*CsRAV1*), en la formación temprana de ramas silépticas al sobre-expresarlo en chopo (*P. tremula*). Este tipo de rama se forma simultáneamente con el brote principal y no a partir de yemas dormidas; su producción incrementa significativamente el número de ramas, lo que implica un incremento en la biomasa, importante para la obtención de biocombustibles (Moreno-Cortés et al., 2012). Según este reciente estudio, el gen *CsRAV1* está estrechamente relacionado con dos genes de la familia *RAV* de *Populus*, los genes *PtRAV1* y *PtRAV2*, los cuales a su vez, comparten un alto grado de similitud con los genes de *Arabidopsis* *AtTEM1*, *AtTEM2* y *AtRAV1*.

El capítulo 3 de esta tesis está centrado en el estudio de caracterización que hemos realizado sobre los genes *PtRAV1* y *PtRAV2* en *Populus sp.*

## OBJETIVOS GENERALES

---

A pesar de la creciente publicación de nuevos datos sobre la función de los genes *TEMPRANILLO* (*TEM*), siguen siendo muchas las cuestiones que quedan pendientes, y resolverlas permitiría alcanzar un conocimiento más completo de la regulación de la inducción floral. En este sentido, la presente tesis doctoral ha querido contribuir a ampliar el conocimiento en uno de los puntos menos estudiados: la regulación de los genes *TEM*. Trabajos realizados en nuestro laboratorio han permitido asignarles la función de represores florales; sin embargo, poco se sabía sobre su regulación transcripcional. La identificación de estos genes como nuevos represores florales en rutas tan importantes como la regulada por el fotoperiodo o la controlada por las hormonas giberelinas sirvió de punto de partida para que otros grupos de investigación se interesasen por ellos y profundizasen en su estudio. Muchos de esos trabajos han sido publicados en el transcurso de la presente tesis doctoral. Por tanto, este trabajo se suma a otros, a la vez que abre nuevas vías de estudio de los genes *TEM* en diferentes rutas de control de la floración, tanto afectadas por factores ambientales, como endógenos, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Aunque en nuestro laboratorio esencialmente se trabaja con *Arabidopsis*, conscientes de la importancia del control de la floración en plantas con relevancia agronómica, se han iniciado estudios de los posibles ortólogos de los genes *TEM* en otros modelos, como son *Oryza*, *Prunus* o *Populus*. Así, una parte de este trabajo se ha dedicado al estudio y caracterización de los genes *TEM/RAV* en el género *Populus*, en colaboración con el Dr. Ove Nilsson del Umeå Plant Science Centre (UPSC), en Suecia.

En resumen, el propósito general de esta tesis es el de profundizar en el estudio de la función y regulación de los genes *TEMPRANILLO* de *Arabidopsis* en diferentes rutas genéticas. Paralelamente, hemos querido iniciar el estudio de la posible redundancia de *TEM1* y *TEM2* con otro gen de la familia *RAV* (a la que pertenecen los genes *TEM*), que codifica el factor de transcripción *RAV1*. El segundo objetivo general de esta tesis es la caracterización de los posibles genes ortólogos de *TEM* en el género *Populus*.

Para cumplir dichos objetivos generales, se ha trabajado en cuatro líneas de investigación:

- Implicación de los genes *TEMPRANILLO* en el control de las transiciones de fase por la acción de los miRNAs miR156 y miR172: juvenilidad y floración (Capítulo 1).
- Efecto de distintos factores ambientales en la regulación de los genes *TEMPRANILLO*: luz, temperatura e interacción entre ambas (Capítulo 2).
- Estudio de los posibles genes ortólogos *TEM/RAV-like* en el género *Populus* (Capítulo 3). Manuscrito (preparado pero no publicado).
- Estudio de la posible redundancia de *RAV1* como miembro más cercano dentro de la familia *RAV*. Este trabajo se desarrollará en paralelo al del resto de los objetivos planteados para los genes *TEM* ya descritos.

**CAPÍTULO 1: SEÑALES ENDÓGENAS: miR156 y miR172**

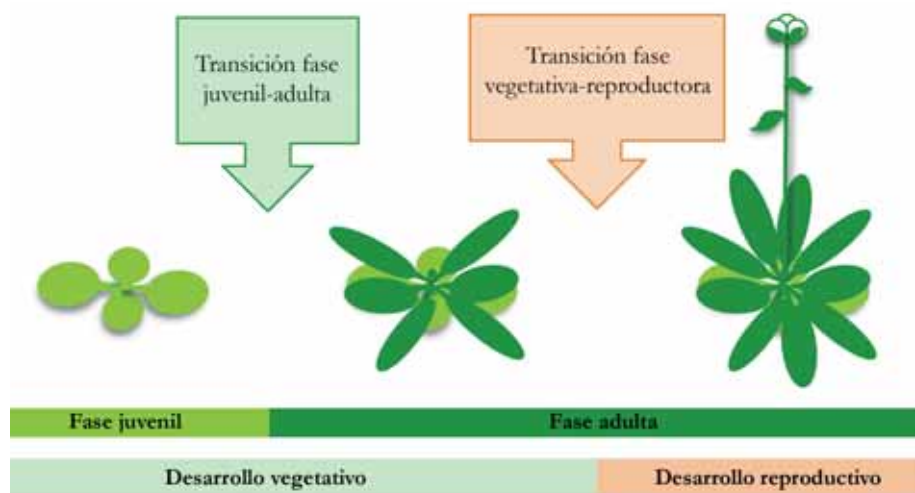
---

## INTRODUCCIÓN

### 1. Transiciones entre las distintas fases del desarrollo

Como se ha comentado en la introducción general, las plantas atraviesan una serie de fases a lo largo de su ciclo vital. Dos de las transiciones críticas entre las distintas etapas del desarrollo son el paso del estado juvenil al adulto, y, posteriormente, el cambio del desarrollo vegetativo al reproductivo. Las fases juvenil y adulta son fácilmente distinguibles por cambios graduales en la morfología foliar (la forma de las hojas, la longitud de los pecíolos y la producción de tricomas abaxiales son algunos de los rasgos más destacados) (Telfer et al., 1997). Por otra parte, el cambio del estado vegetativo al reproductivo se observa claramente cuando la planta adquiere competencia reproductiva y se produce el alargamiento del tallo donde se formarán las estructuras reproductoras (Fig. 4). En ese momento se produce un cambio irreversible en la identidad del meristemo apical del tallo (SAM, por sus siglas en inglés), el cual deja de formar hojas para formar las flores.

El control del inicio de estas transiciones es importante para garantizar el éxito reproductivo, manteniendo una fase juvenil suficientemente larga para acumular reservas y permitir la floración en el momento óptimo, teniendo en cuenta tanto factores endógenos como ambientales.



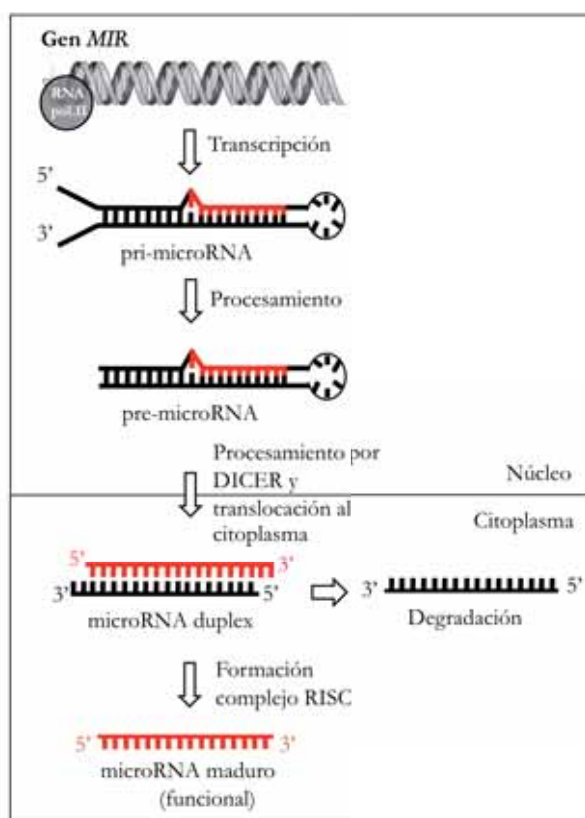
#### Figura 4. Fases del desarrollo y sus correspondientes transiciones de fase

Durante el desarrollo ocurren una serie de cambios morfológicos, más o menos visibles a simple vista. Inicialmente, éstos ocurren en la hoja, señalando el cambio de la fase juvenil a la adulta. Después de un tiempo determinado tanto por factores ambientales como endógenos, las plantas adultas alcanzan la competencia reproductiva y pasan a la siguiente fase de desarrollo en la que producen las estructuras reproductoras.

Si bien estas dos transiciones están separadas temporalmente, están reguladas por los mismos factores: el fotoperiodo, la temperatura o las hormonas giberelinas (Poethig, 2003). En las rutas genéticas que responden a estos factores actúan multitud de genes que controlan la correcta determinación temporal de las transiciones. Estudios desarrollados en *Arabidopsis thaliana* sugieren que un mismo tipo de molécula parece regular el desarrollo de la planta según su edad, controlando así los cambios de la fase juvenil a la adulta y la transición a la floración (Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009). Estas moléculas son los microRNAs (miRNAs) miR156 y miR172.

## 2. Mecanismo de acción de los microRNAs

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes de entre 20 y 24 nt. Descritos por primera vez en *Caenorhabditis elegans* son componentes clave en la regulación post-transcripcional de la expresión génica en eucariotas, mediante el reconocimiento de secuencias complementarias (revisado en Voinnet, 2009).



**Figura 5. Mecanismo de biogénesis de miRNAs maduros**

Esquema de la biogénesis y el procesamiento de los miRNAs hasta la formación del miRNA maduro.

Los miRNAs están, generalmente, codificados por varios genes *MIR*. La biogénesis de los miRNAs maduros (Fig. 5) se inicia con la transcripción de los genes *MIR* mediante la enzima RNA polimerasa II; el resultado es una secuencia larga y de cadena sencilla denominada pri-miRNA. Los pri-miRNAs se pliegan formando una estructura compleja en

la que una parte tiene forma de horquilla (denominada *stem-loop* o *hairpin*, en inglés), que se corta mediante una enzima *DICER-like* (DCL) para formar la estructura conocida como pre-miRNA, que es un precursor del miRNA maduro. Las estructuras pre-miRNA se procesan y se cortan, quedando dos cadenas parcialmente complementarias, conocidas como dúplex. Finalmente, una de las cadenas es incorporada a los complejos de silenciamiento (RISC) para guiar la regulación génica mediante silenciamiento de los genes diana que contienen una secuencia complementaria al miRNA, mientras que la otra cadena es degradada. La regulación predominante en plantas se produce por corte directo de los mRNAs diana complementarios, que son posteriormente degradados. Algunos miRNAs, como el miR172, regulan a sus genes diana mediante inhibición de la traducción, un mecanismo más generalizado en plantas de lo que se pensaba inicialmente (Bartel, 2004; Brodersen et al., 2008; Jones-Rhoades et al., 2006).

En el caso del miRNA miR156, en *Arabidopsis* existen 8 genes *MIR156* (*MIR156A-H*) y 4 genes *MIR157* (*MIR157A-D*) que forman 5 miRNAs maduros muy similares (Tabla 1), que se identifican de manera simplificada como miR156.

	Secuencia miRNA maduro
miR156a	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
miR156b	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
miR156c	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
miR156d	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
miR156e	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
miR156f	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
miR156g	<b>C</b> GACAGAAGAGAGUGAGCAC
miR156h	UGACAGAAGA <b>AAG</b> AGAGCAC
miR157a	<b>U</b> UGACAGAAGAU <b>AG</b> AGAGCAC
miR157b	<b>U</b> UGACAGAAGAU <b>AG</b> AGAGCAC
miR157c	<b>U</b> UGACAGAAGAU <b>AG</b> AGAGCAC
miR157d	UGACAGAAGAU <b>AG</b> AGAGCAC

**Tabla 1. Secuencias de miRNAs maduros generados de los distintos locus MIR156 y MIR157**  
Están indicados en negrita los cambios nucleotídicos en las distintas especies de miR156, utilizando miR156a como referencia.

La secuencia de miR156 maduro es complementaria a una región concreta de algunos genes *SPL* (clados *SPL3*, *SPL9* y *SPL10*) y está altamente conservada, por lo que es fácil detectar otras posibles dianas mediante programas bioinformáticos de análisis de secuencias, como miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). La figura 6 muestra la complementariedad entre las secuencias de miR156a y *SPL9*, como ejemplo.



**Figura 6. Secuencia de reconocimiento de *SPL 9* por *miR156***

Se destaca el sitio de unión de *miR156* a la región codificante de *SPL9*, así como la secuencia de reconocimiento. Fuente: TAIR [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)

De *miR172* se han descrito 5 genes *MIR172A-E* que forman 3 miRNAs maduros distintos en *Arabidopsis* (Chen, 2004). Los genes *MIR172A* y *MIR172B* generan uno de ellos; *MIR172C* y *MIR172D* forman otro; y *MIR172E* el tercero. Entre el miRNA maduro generado por *MIR172A/MIR172B* y el generado por *MIR172C/MIR172D* hay un cambio en un nucleótido, al igual que entre *MIR172A/MIR172B* y *MIR172E*. El modo de acción de este miRNA es mediante silenciamiento traduccional, aunque también puede cortar a sus mRNA diana (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004; Schwab et al., 2006). La unión por complementariedad se ha detectado en la región codificante, cerca de la región 3' UTR de algunos genes de la familia *APETALA2 (AP2-like)* (Chen, 2004). A continuación se muestran las secuencias de los 3 miRNAs maduros (Tabla 2).

	Secuencia miRNA maduro
miR172a	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
miR172b	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
miR172c	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG
miR172d	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG
miR172e	<b>G</b> AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU

**Tabla 2. Secuencias de los miRNAs maduros generados de los distintos locus *MIR172***

Están indicados en negrita los cambios nucleotídicos en las distintas especies de *miR172* utilizando la secuencia de *miR172a* como referencia.

En general, la elevada complementariedad entre un miRNA y los genes a los que silencia ya identificados permite predecir nuevas dianas por medio de herramientas bioinformáticas.

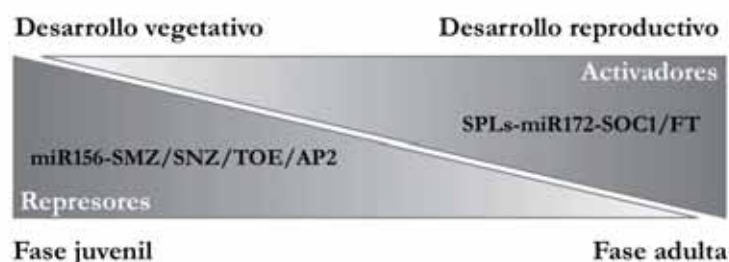
### 3. Función de *miR156* y *miR172* en el control de la fase juvenil y la floración

Los miRNAs *miR156* y *miR172* son componentes clave en el control genético de las transiciones antes mencionadas y tienen como genes diana por un lado, varios factores de transcripción SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE), regulados por *miR156*, que promueven el cambio de la fase juvenil a la adulta; y, por otro, varios miembros de la familia *AP2-like*, dianas de *miR172*, que regulan la transición a la fase reproductora y el desarrollo floral (Bergonzi & Albani, 2011; Fornara & Coupland, 2009; Huijser & Schmid, 2011; Poethig, 2009; Zhu & Helliwell, 2011).



Ambos miRNAs se expresan de forma secuencial y opuesta, y están relacionados mediante *SPL9*, en redundancia con *SPL10* (Wu et al., 2009). Una disminución progresiva de la expresión de miR156 a lo largo del desarrollo conlleva un incremento paulatino de *SPL9* y con ello un incremento de los niveles de miR172b, que reprime post-transcripcionalmente a los represores *AP2-like*, lo que finalmente da lugar a un incremento en los niveles de FT y *SOC1* y, por tanto, se promueve la floración (Fig. 7) (Mathieu et al., 2009; Wu et al., 2009; Yant et al., 2010).

Todo ello convierte a este módulo regulador miR156/*SPL9*/miR172 en una ruta clave para determinar el momento en que han de llevarse a cabo las transiciones de fase a lo largo del desarrollo de la planta. Debido a esta importancia funcional, la expresión de miR156, *SPLs* y miR172 está regulada por sus propios genes diana en forma de bucles de retroalimentación positiva o negativa (Wu et al., 2009), lo que parece contribuir a la estabilidad de las transiciones de fase al amortiguar los pequeños cambios de expresión (en el caso de retroalimentaciones negativas), o bien, amplificando un cierto efecto (en el caso de retroalimentaciones positivas) (Martínez et al., 2008).



**Figura 7. Esquema de la distribución temporal de factores represores y activadores implicados en procesos relacionados con el desarrollo vegetativo y reproductivo**

La transición de la fase juvenil a la adulta y el paso del desarrollo vegetativo al reproductivo están controlados por multitud de represores y activadores que controlan el momento óptimo en que éstas se han de producir. Los represores tienen un papel importante durante la fase juvenil, en el desarrollo vegetativo, evitando un cambio de fase prematuro. En cambio, cuando las señales endógenas y ambientales son las adecuadas, su efecto represor desciende para permitir la activación de otros genes que serán los activadores de los genes que, finalmente, acabarán promoviendo la adquisición de la competencia reproductiva.

### **3.1 Función del módulo miR156/*SPL* en el control de la transición de fase juvenil a adulta y la inducción floral**

Uno de los primeros miRNAs identificados en las plantas fue miR156, descrito por primera vez en *Arabidopsis* (Reinhart et al., 2002) y ampliamente representado en multitud de especies de dicotiledóneas, monocotiledóneas, musgos y helechos.

Predicciones *in silico* y validaciones experimentales posteriores permitieron identificar varios genes *SPL* como el grupo mayoritario de genes diana silenciados por miR156; aunque no son los únicos, al identificarse también un gen que codifica una proteína de la familia de

los inhibidores de la invertasa/pectin metilesterasa como diana de miR156h (Addo-Quaye et al., 2008). Las proteínas de la familia SPL fueron inicialmente descritas en *Antirrhinum majus* como SBP1 y SBP2. Su nombre SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) hace referencia al gen *SQUAMOSA* de *A. majus* (homólogo al gen *AP1* de *Arabidopsis*) al que se unen (Klein et al., 1996).

Estos factores de transcripción tienen una secuencia altamente complementaria a miR156, con entre una y tres discordancias en su secuencia (Rhoades et al., 2002). Actualmente se sabe que miR156 reprime la actividad de 10 de los 17 miembros de la familia SPL en *Arabidopsis*, por tanto, no todos ellos están regulados por este miRNA (Rhoades et al., 2002). miR156 actúa induciendo el corte y la degradación de los transcritos de los *SPLs* que tienen secuencias complementarias a él. Sabiendo que miR156 es necesario para mantener la fase juvenil, la degradación de los genes diana *SPL* sugiere que estas proteínas actúan en sentido opuesto, promoviendo la transición a la adulta (Schwarz et al., 2008; Wu & Poethig, 2006).

Se ha observado que el sitio de unión de miR156 a los *SPL* está conservado en multitud de plantas terrestres, lo que sugiere que el módulo regulador miR156/SPL es evolutivamente antiguo y juega un papel importante en el desarrollo de diferentes especies (Guo et al., 2008).

### **3.1.1 MIR156 mantiene la fase juvenil y retrasa la transición floral**

En las plantas silvestres de *Arabidopsis*, la expresión de miR156 es elevada al principio del desarrollo y decae a lo largo de la fase adulta (Wang et al., 2009; Wu & Poethig, 2006), mientras que los niveles de sus transcritos diana (*SPLs*) muestran un patrón opuesto: son inicialmente bajos e incrementan a lo largo de la madurez de la planta (Cardon et al., 1997; Schwab et al., 2005; Wang et al., 2009; Wu & Poethig, 2006). Esta observación sugiere que miR156 actúa durante los primeros estadios del desarrollo asegurando una fase juvenil suficientemente larga; y que su control sobre los *SPLs*, por medio de silenciamiento génico, retrasa la transición a la fase adulta (Schwarz et al., 2008; Wu & Poethig, 2006; Wu et al., 2009). De forma complementaria, los experimentos de sobre-expresión constitutiva de miR156 (plantas *35S::MIR156*) muestran que este miRNA induce la producción de un elevado número de hojas juveniles (o lo que es lo mismo, alarga la fase juvenil), lo que se relaciona con un retraso en la aparición de tricomas en la cara abaxial de la hoja y un retraso más o menos sutil en la floración dependiendo del fotoperiodo. Las plantas cultivadas en SD muestran un retraso evidente en la floración, mientras que en las plantas cultivadas en LD este efecto es más moderado (Schwab et al., 2005; Wu & Poethig, 2006). Por el contrario, las plantas que expresan una secuencia parcialmente complementaria a miR156, capaz de secuestrar al miRNA endógeno (lo que se conoce como "*mimicry*"; en este caso, plantas *35S::MIM156*), muestran el fenotipo contrario: menos hojas juveniles, o lo que es lo mismo, un adelanto de la fase adulta, con aparición temprana de tricomas en la cara abaxial de la hoja

y una floración avanzada en cuanto al número de hojas aunque florecen aproximadamente a la vez que las plantas silvestres en cuanto a días (Franco-Zorrilla et al., 2007; Todesco et al., 2010). Estos resultados indican que miR156 es importante para el mantenimiento de la fase juvenil, ya que retiene a la planta en estado vegetativo y retrasa el comienzo de la fase adulta y, con ello, la transición floral. miR156 no sólo es necesario sino también suficiente para el mantenimiento de la fase juvenil (Wu et al., 2009). Se cree que constituye una ruta endógena, autónoma e independiente de las condiciones ambientales y que regula la floración de manera dependiente de la edad de la planta.

Además, miR156 también regula varios caracteres relacionados con la producción de hojas. El denominado plastocrono, definido como el tiempo que pasa entre la formación de dos hojas consecutivas, también se ve alterado tanto en las plantas *35S::MIR156* como en las *35S::MIM156*: la sobre-expresión de miR156 provoca un incremento en la velocidad de producción de hojas (o lo que es lo mismo, plastocrono corto) y, al contrario, las plantas que silencian miR156 invierten más tiempo en producirlas (plastocrono largo) (Wang et al., 2008).

### **3.1.2 Los genes *SPLs* promueven la fase adulta y la inducción floral**

En *Arabidopsis*, los genes de la familia *SPL* se distribuyen en 7 clados, de los cuales sólo 4 son regulados por miR156: clado *SPL3* (*SPL3/SPL4/SPL5*), clado *SPL9* (*SPL9/SPL15*), clado *SPL10* (*SPL10/SPL11/SPL2*) y clado *SPL13* (*SPL13/SPL6*) (Guo et al., 2008). El estudio de estos genes ha sido dificultoso debido a una elevada redundancia funcional que complica el análisis fenotípico de los mutantes simples, y a la regulación compleja provocada por la presencia de secuencias de reconocimiento para miR156 tanto en la zona codificante como en la región 3' UTR (Gandikota et al., 2007). Actualmente se tiene un mayor conocimiento de su función y regulación en diferentes estadios del desarrollo, gracias al uso de mutantes múltiples y de la sobre-expresión constitutiva de versiones resistentes a la acción de silenciamiento del miRNA (Gandikota et al., 2007; Schwarz et al., 2008; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009). *SPL9* y *SPL15* juegan un papel clave en la transición de la etapa juvenil a la adulta, la regulación de la forma de la hoja, el control del número de células y tamaño de las hojas y la velocidad de producción de hojas, y, por otro lado, *SPL3/SPL4/SPL5*, además de controlar la iniciación de los tricomas abaxiales también son importantes en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva y el desarrollo floral posterior (Yamaguchi et al., 2009), en el control del número de células y el tamaño de las hojas (Usami et al., 2009; Wang et al., 2008; Wu & Poethig, 2006; Wu et al., 2009) pero no afectan a la forma de la hoja ni al plastocrono.

A grandes rasgos, estos genes operan en distintas rutas, promoviendo la formación de las características morfológicas propias de la fase adulta, y en último término, la floración. En las plantas silvestres, los genes *SPLs* muestran una expresión elevada tras la inducción floral (con un patrón opuesto al de miR156) y su sobre-expresión acorta la fase juvenil y acelera la

floración (Cardon et al., 1997; Cardon et al., 1999; Schwarz et al., 2008; Wu & Poethig, 2006). Por ejemplo, la sobre-expresión de *SPL3* acelera la producción de tricomas en la cara abaxial de la hoja y el incremento del número de células y, además, causa una floración temprana (Cardon et al., 1997; Usami et al., 2009; Yu et al., 2010). Respecto a este fenotipo, hay que destacar que si bien la sobre-expresión de las versiones de *SPL3/SPL4/SPL5* resistentes a la acción de miR156 (*35S::rSPL3/35S::rSPL4/35S::rSPL5*) promueve una floración temprana, no se han observado cambios fenotípicos en el mutante sencillo *sp3* (Wu & Poethig, 2006) y, por el momento, parece que no hay disponibles líneas mutantes para *SPL4* y *SPL5*. La ausencia de fenotipos en los mutantes sencillos de estos y otros SPLs podría indicar que existe una elevada redundancia funcional en los diferentes grupos (Wang et al., 2008).

Además de la regulación por la acción de miR156, se ha descrito muy recientemente que *SOC1* y *FT* son reguladores de *SPL3/SPL4/SPL5*, mediante unión directa a sus promotores, en respuesta a señales de fotoperiodo inductivo (Jung et al., 2012a). Los mismos autores también sugieren la función de un módulo *SOC1/SPL* como mediador en la promoción de la floración en condiciones no inductoras de SD, a través de la regulación de las hormonas GAs.

En relación con las GAs, resultados recientes relacionan a las proteínas DELLA (reguladores negativos de la señalización de las GAs) con la regulación de SPL. Se ha sugerido que las GAs podrían activar la acción de SPLs a través de la degradación de las DELLA, tanto en LD como SD. Recientemente, se ha demostrado que las DELLA reprimen a *SPL3* en la hoja y a *SPL3/SPL4/SPL5* en el SAM, además de reducir los niveles de miR172 en la hoja en LD y regular la actividad transcripcional de *SPL9* (Galvão et al., 2012; Yu et al., 2012). Así, la acción de las GAs sería la señal inductora a través de la regulación de los SPLs (en la hoja o en el SAM), de manera independiente del fotoperiodo.

Por su parte, *SPL9/SPL15* también promueven los rasgos morfológicos de las hojas adultas: incremento de tamaño y número de células, formación de tricomas abaxiales y márgenes foliares serrados (Telfer et al., 1997; Usami et al., 2009); además, reducen el ratio de producción de hojas (plastocrono alterado) y aceleran la floración. Parece que la promoción de tricomas abaxiales en las hojas adultas podría producirse por mediación de *SPL9* a través de la activación de la transcripción de *MIR172B* (Wu et al., 2009), así como de otros genes relacionados directamente con la producción de tricomas. Si bien los mutantes sencillos *sp9* y *sp15* no muestran cambios fenotípicos significativos de retraso de la floración, estos sí se evidencian en el doble mutante *sp9 sp15*; además, las plantas que expresan una versión de *SPL9* resistente a la acción de miR156, bajo el control de su propio promotor (*pSPL9::rSPL9*), muestran una ausencia completa de fase juvenil, ya que forman únicamente hojas adultas, y además las producen muy lentamente (Schwarz et al., 2008; Usami et al., 2009; Wang et al., 2008; Wang et al., 2009; Wu & Poethig, 2006; Wu et al.,

2009), lo que coincide con el fenotipo observado en las plantas *35S::MIM156*.

Estos dos grupos, SPL3/SPL4/SPL5 y SPL9/SPL15, comparten redundancia funcional en la producción de tricomas abaxiales, así como en la promoción de la floración y la identidad del meristemo floral. Además, ambos grupos presentan un rápido incremento de su expresión en el meristemo apical del tallo en condiciones de fotoperiodo inductor (Schmid et al., 2003).

Estos factores de transcripción presentan una secuencia altamente conservada, el denominado dominio SBP (Cardon et al., 1999; Yamasaki et al., 2004) que se une a motivos de DNA que contienen el núcleo GTAC. Esto, unido a técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), ha facilitado la identificación de genes diana directos. En concreto, se ha descrito que SPL3 promueve la transcripción de *FRUITFULL (FUL)*, *LEAFY (LFY)* y *APETALA1 (AP1)* (Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009); los cuales a su vez promueven la activación de genes que producirán los órganos florales; SPL4 y SPL5, la de *SOC1*, *FUL*, *LFY*, *AP1* y *FT* (Yamaguchi et al., 2009); y SPL9, la de *SOC1*, *AP1*, *FUL* y *AGAMOUS-LIKE 42 (AGL42)* (Wang et al., 2009). Estas vías de control de genes que promueven directamente la floración son en parte independientes de la vía de miR172, y funcionan en parte en paralelo al módulo FT/FD en el SAM. Se ha comprobado que la expresión en el SAM de rSPL3 es suficiente para inducir la floración a través de SOC1 y FUL (Wang et al., 2009), y SPL9 puede activar directamente a los integradores florales en una ruta alternativa a la de miR172/AP2.

Por tanto, SPL3 y SPL9 actúan en paralelo para activar al inductor floral FT y a los otros integradores (SOC1 y FUL) y asegurar la floración en respuesta al fotoperiodo (Wang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2009) e independientemente de él, a través de la acción de las GAs que regulan su expresión tanto en LD como en SD (Galvão et al., 2012; Yu et al., 2012). Por tanto, se unen en este punto tres de las rutas más importantes del control de la floración: la dependiente del fotoperiodo, la dependiente de la edad, y la de las GAs.

Como se ha comentado, existe una regulación en forma de bucle de retroalimentación entre miR156, miR172 y sus genes diana. En el caso de miR156, se ha observado una retroalimentación negativa entre SPL9/SPL10 y miR156a. En las plantas *pSPL9::rSPL9* la expresión de miR156a es más alta respecto a los valores silvestres en SD. La evidencia de que miR156 (y miR172) es regulado de manera positiva por los genes a los que silencia sugiere que la expresión de esos genes está modulada por un bucle de retroalimentación negativo que estabiliza y atempera los pequeños cambios que puedan producirse en los niveles de sus mRNA (Wu et al., 2009).

### 3.2 Función del módulo miR172/AP2 en el control de la transición y el desarrollo floral

Al contrario que miR156, miR172 promueve la floración a través del silenciamiento de represores florales (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004; Jung et al., 2007; Kim et al., 2006; Schmid et al., 2003; Schwab et al., 2005; Yant et al., 2010). Mientras el módulo miR156/SPL incorpora señales endógenas relacionadas con la edad de la planta a las rutas de control de la floración, miR172 actúa por debajo de éste regulando negativamente a varios miembros de la familia de factores de transcripción AP2, la cual presenta dos dominios de unión a DNA del tipo AP2 y regula la transición floral y el desarrollo floral (Mathieu et al., 2009; Schmid et al., 2003; Wu et al., 2009). A través de la unión directa al promotor de *MIR172B*, SPL9 promueve la transcripción de este miRNA, enlazando así la regulación de las transiciones de fase a través de un módulo miR156/SPL9/miR172 (Wu et al., 2009). Acorde a esta regulación, miR172 incrementa su expresión durante el desarrollo de manera opuesta al decrecimiento de miR156 (Aukerman & Sakai, 2003; Jung et al., 2007; Wu et al., 2009), lo que provoca la regulación negativa de sus genes diana *AP2*, *TARGET OF EAT 1/2/3* (*TOE1/TOE2/TOE3*), *SCHLAFMÜTZE* (*SMZ*) y *SCHNARCHZAPFEN* (*SNZ*) (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004; Schmid et al., 2003), que actúan como represores de *FT* y *SOC1*. Sin embargo, estos no parecen ser los únicos genes diana de miR172, ya que recientemente se han identificado otros genes que contienen una secuencia complementaria a miR172, con un número variable de disparidades (“*mismatches*”). Entre los nuevos genes diana identificados hay cinco N-acetilglucosamina desacetilasas y una tirosina fosfatasa, de función aún no descrita (Zheng et al., 2012). Recientemente se ha publicado que miR172 también induce la expresión de *SPL3/SPL4/SPL5* a través de sus genes diana, ya que se ha observado un incremento en los niveles de *SPL3/SPL4/SPL5* en las plantas *35S::MIR172* y en plantas mutantes para varios de sus genes diana. Los autores sugieren que las señales de miR156 y miR172 no estarían directamente interrelacionadas, sino que ambas convergerían en la regulación de los genes *SPL* (Jung et al., 2011).

En las plantas que sobre-expresan o silencian a miR156, la expresión de miR172 está alterada y, en las plantas silvestres, el patrón de acumulación de miR172 es complementario y opuesto al que presenta miR156 y similar al de *SPL9*. Estudios de expresión y de ChIP han confirmado la unión directa de SPL9 al promotor de *MIR172B*, que contiene las secuencias SBP que reconocen las proteínas SPLs (Wu et al., 2009).

La expresión de algunas de las especies codificadas por *MIR172*, como miR172a, miR172b y miR172c, es baja durante la fase juvenil y va aumentando a medida que avanza el crecimiento de la planta, alcanzando un máximo cuando la planta llega a la fase adulta. Esto parece promover la transición a la fase adulta reproductiva y la transición floral. Otras especies, como miR172d y miR172e, tienen niveles de expresión muy bajos y no parecen mostrar cambios significativos durante el desarrollo (Jung et al., 2007).

Su funcionalidad se ha demostrado por los cambios observados en los niveles de proteína de sus genes diana, por ejemplo de AP2, al limitar su acumulación en las plantas *35S::MIR172* en comparación con las plantas silvestres (Chen, 2004). Las plantas que expresan constitutivamente miR172 (*35S::MIR172a* y *35S::MIR172b*) presentan tricomas abaxiales antes que las plantas silvestres (Wu et al., 2009; Yant et al., 2010), es decir, tienen acortada la fase juvenil, si bien otros rasgos, como la forma de la hoja, no se ven afectados. El efecto opuesto se ha observado en las plantas silenciadas para miR172a. La sobre-expresión causa un fenotipo pleiotrópico, lo que sugiere que tiene un importante papel en el control de múltiples factores que participan en distintos aspectos del desarrollo, como el tiempo de floración, la identidad de los órganos florales y, en general, el desarrollo vegetativo (Zhu & Helliwell, 2011). Las plantas sobre-expresantes de miR172 muestran un fenotipo de floración temprana, tanto en LD como en SD, lo que se corresponde con valores de expresión de *FT* elevados sin que los valores de *CO* se vean alterados.

De manera similar a los *SPLs*, los genes *AP2-like* se expresan en diversos tejidos (presentan especificidad espacial y temporal) y presentan redundancia funcional y efectos pleiotrópicos. Uno de los primeros implicados en la regulación de la floración fue TOE1; su sobre-expresión (en plantas *toe1-D*) provoca un retraso en la floración, mientras que el mutante *toe1* presenta el fenotipo opuesto y florece significativamente más pronto que las plantas silvestres. Este fenotipo es más fuerte en el doble mutante *toe1 toe2*, lo que indica que podrían tener una función redundante. Este doble mutante también presenta un adelanto de la aparición de tricomas abaxiales, lo que relaciona a TOE1 y TOE2 con el mantenimiento de características de hoja juvenil, aunque no varía la forma de la hoja (Aukerman & Sakai, 2003; Jung et al., 2007; Wu et al., 2009). De forma similar a lo que ocurre entre miR156 y SPL9, miR172 y TOE1 también muestran una expresión complementaria y opuesta durante el desarrollo (Jung et al., 2007).

La sobre-expresión de SMZ y SNZ también provoca un retraso de la floración, especialmente en LD. Por el contrario, parece que los mutantes *smz* y *snz* no florecen antes que las plantas silvestres, aunque sí lo hacen en combinación con mutantes *toe*. La observación de que la floración temprana del cuádruple mutante *toe1 toe2 smz snz* seguía siendo relativamente más tardía que la que presentan las plantas que sobre-expresan miR172 (Mathieu et al., 2009), sugería que miR172 está controlando la floración también a través de otros factores. Con el séxtuple mutante *toe1 toe2 toe3 smz snz ap2* se consiguió el mismo fenotipo de floración temprana que el de las plantas *35S::MIR172* (Yant et al., 2010). AP2, inicialmente caracterizado como regulador del desarrollo floral al controlar directamente a genes de identidad del órgano floral (Bowman et al., 1989), parece que también tiene un papel en el control de la floración. De hecho, se ha descrito a AP2 como regulador de los integradores florales *SOC1* y *FUL* (Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010). Además, parece que SMZ puede unirse directamente a la región promotora de *FT*, *SOC1* y *AP1* (Mathieu et

al., 2009). De esta manera, los genes diana de miR172 regulan a los inductores de la floración.

Se ha descrito un bucle de retroalimentación negativa entre miR172b y TOE1/TOE2, en el cual miR172b reprime a los TOE a la vez que estos activan al miRNA (Wu et al., 2009). Este efecto se ha observado en los mutantes *toe1toe2*, en los que el miRNA maduro y el precursor de miR172b estaban reducidos, y en las plantas sobre-expresantes de TOE1, en las que el precursor de miR172b presentaba niveles ligeramente más altos. Además, se han descrito otros bucles entre miR172b y AP2, además de una unión de AP2 a miR156e (en una regulación positiva); lo que al final asegura una activación de AP2, además de autoactivarse a sí mismo por unión a su propio promotor, mientras que SMZ reprime a varios genes diana de miR172 (Mathieu et al., 2009; Schwab et al., 2005; Yant et al., 2010), que a su vez reprimen a varios SPLs (Jung et al., 2011). Todo ello evidencia la existencia de una compleja regulación entre todos los elementos de la ruta miR156/SPL/miR172/AP2-like que contribuye a la estabilización de las transiciones del desarrollo.

### **3.3 Regulación de miR156 y miR172**

Aparte de la regulación ya descrita de miR172b por SPL9, parece que ambos miRNAs podrían estar regulados por factores ambientales y endógenos.

Recientemente se ha descrito que la temperatura es un factor de regulación para miR156 y miR172 (Kim et al., 2012; Lee et al., 2010). Como se detallará en el siguiente capítulo, pequeñas variaciones en la temperatura, como un descenso moderado de 23/22°C a 16°C es suficiente para retrasar la floración, y parte de esta respuesta depende de los genes de la ruta autónoma *FCA/FVE* (Blázquez et al., 2003).

Un estudio reciente señala que la proteína FCA regula el procesamiento del pri-miR172a e incrementa los niveles del miRNA maduro al aumentar la temperatura (Jung et al., 2012b; Lee et al., 2010); y este cambio es capaz de inducir la floración al reducir los represores de la familia AP2 que regulan a *FT*. Además, en la regulación de miR172 está implicada la proteína SVP, que une directamente al promotor de *MIR172A* para inhibir su expresión en condiciones de baja temperatura ambiental (16°C) (Cho et al., 2012). En el caso de miR156 se ha observado la respuesta contraria, una mayor acumulación a 16°C que a 23°C (Lee et al., 2010). En consecuencia, los respectivos genes diana de estos miRNAs se ven afectados indirectamente por la temperatura. En el caso de los genes *SPL*, fundamentalmente *SPL3/SPL5* y *SPL9*, incrementan su expresión a 23°C respecto a 16°C; mientras que los genes *AP2-like* presentan un incremento de expresión a 16°C, especialmente *TOE1*, *TOE2* y *SNZ* (Kim et al., 2012; Lee et al., 2010). Además, en condiciones favorables de fotoperiodo, la regulación del procesamiento de miR172 por GI promueve un incremento en sus niveles y, con ello, un cambio de la expresión de *FT* independiente de CO, dirigido a través de la represión de sus genes diana, concretamente de *TOE1* (Jung et al., 2007).



Muy recientemente, se ha sugerido que los azúcares podrían formar parte de los factores que regulan el cambio de la fase juvenil a la adulta, modulando la expresión de miR156 (concretamente de *MIR156A* y *MIR156C*), al reprimir su acumulación a través de la degradación de sus transcritos primarios y mediante represión transcripcional (Yang et al., 2013; Yu et al., 2013). Además, se ha publicado el efecto de la trehalosa-6-fosfato (T6P) y de su enzima catalizadora, la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS1) en el control de la floración a través de la regulación de *SPL3/SPL4/SPL5* (en el SAM), y de *FT* (en las hojas), de manera parcialmente independiente de miR156 (Wahl et al., 2013).

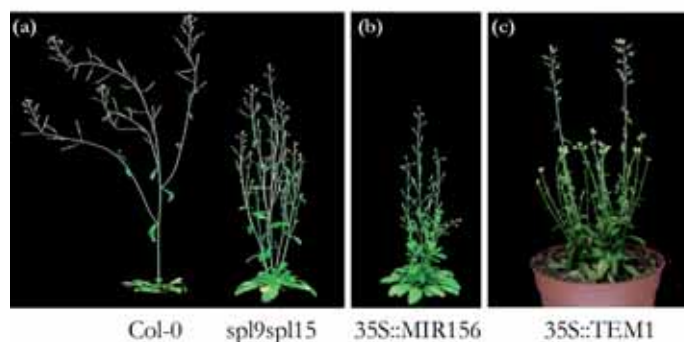
Sin embargo, a pesar del avance en el conocimiento de nuevos factores que regulan la acción de miR156, se conoce poco sobre los mecanismos que determinan su disminución a lo largo del desarrollo.

#### **4. Los genes *TEMPRANILLO* y su participación en el control de las transiciones durante el desarrollo**

Previamente en nuestro laboratorio se identificó a los genes *TEM1* y *TEM2* como dos importantes reguladores de la floración, tanto en LD (Castillejo & Pelaz, 2008) como en SD (Osnato et al., 2012). Como se ha detallado en la introducción general, estos actúan reprimiendo a dos de los factores más importantes que promueven la floración en condiciones de fotoperiodo inductor y no inductor: el gen *FT* y las hormonas GAs a través de los genes *GA3ox1/2*.

Los genes *TEM* juegan un papel clave al retrasar la floración ya que permiten a las plantas adquirir las reservas necesarias para producir las flores. Incluso en condiciones inductoras, las plantas no florecen inmediatamente después de germinar. Los genes *TEM*, que se expresan a muy altos niveles al principio del desarrollo, retrasan el momento de la floración aún en condiciones inductoras al mantener reprimido a *FT* (Castillejo & Pelaz, 2008). Ahora sabemos que, además de los genes *TEM*, existe una ruta endógena de control de la transición floral en respuesta a la edad: la ruta de miR156/miR172.

Las expresiones de *TEM1* y *TEM2* caen a lo largo del desarrollo de una manera similar a la caída de la expresión de miR156 (Wang et al., 2009), lo que podría sugerir que uno podría estar controlando la expresión del otro a lo largo del desarrollo. Esta caída en los niveles de *TEM* permite el incremento de expresión de *FT*, es decir permite a su activador CO, que se mantiene prácticamente constante a lo largo del desarrollo, realizar su función. *TEM1* y *TEM2*, al ser redundantes, actuarían evitando una floración precoz. Además, el fenotipo de floración tardía y pérdida de dominancia apical de las plantas sobre-expresantes de miR156 y de los mutantes *sp19 sp115* es muy similar al fenotipo observado en plantas sobre-expresantes de *TEM1* y de *TEM2* (Fig. 8).



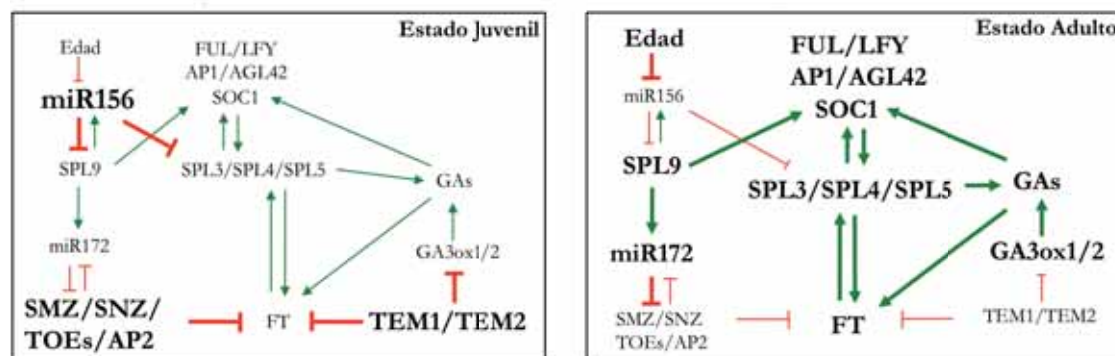
**Figura 8. Comparación de los fenotipos de las plantas *sp19 sp15*, *35S::MIR156* y *35S::TEM1***

Los paneles (a) y (b) provienen del artículo publicado por Schwarz y colaboradores, 2008. Todos los genotipos han sido cultivados en LD. Se observa que *sp19 sp15*, *35S::MIR156* y *35S::TEM1* pierden la dominancia apical y florecen tarde. (c) Foto de *35S::TEM1* después de 6 semanas.

*TEM2* parece estar más expresado en las plantas *smz-D* (mutante con ganancia de función) en la hoja y en el meristemo apical del tallo que en el tipo silvestre, mientras que la expresión de *TEM1* no está alterada (Mathieu et al., 2009). Por experimentos de ChIP-seq se confirmó la unión de SMZ a *TEM1* en las inflorescencias y de AP2 a *TEM1* en las hojas (Yant et al., 2010). Todos estos resultados indican conexiones entre los genes *TEM* y la ruta de miR156/SPL/miR172/AP2.

Las similitudes observadas entre la función y la expresión de miR156 y TEM nos han llevado a plantearnos una posible relación entre ambos genes y a preguntarnos si *TEM1* y *TEM2* pueden actuar como reguladores de la transición a la fase reproductiva de manera dependiente de la edad.

El siguiente esquema (Fig. 9) resume algunas de las interacciones entre los miRNAs miR156 y miR172 y los factores de transcripción SPL con sus respectivos genes diana, en el control de la fase juvenil y la floración mediado por la edad. Además, hemos incluido la función de los genes *TEM* como reguladores de la floración a partir de la represión de los genes *FT* y *GA3ox1/2*, en una ruta que hasta ahora se ha descrito en paralelo a la de los miRNAs. Este capítulo va a tratar de esclarecer si ambas rutas comparten reguladores comunes y si los genes *TEM* están implicados en la regulación de la floración en la misma ruta que miR156.



**Figura 9. Esquema simplificado de las interacciones entre los distintos componentes de las rutas de regulación de la floración por la edad y la acción de los genes TEMPRANILLO**

La transición del estado juvenil al adulto en *Arabidopsis thaliana* está regulada por la acción complementaria de miR156 y miR172. La expresión de miR156 durante las primeras etapas del desarrollo permite mantener el estado juvenil de las plantas a través de la regulación negativa de sus genes dianas, los factores *SPL*. Esta represión evita que miR172 se induzca, lo que origina que los factores *AP2-like* repriman, al igual que *TEM*, a *FT* para evitar una floración temprana. A su vez, *TEM* también reprime a los genes *GA3ox1/2* responsables de la biosíntesis de las hormonas giberelinas, que a su vez también confluyen en la regulación de los *SPLs*. Cuando la planta pasa del estado juvenil al adulto, la edad promueve la caída en los niveles de miR156, lo que permite que *SPL9* se acumule e induzca a miR172. La función represora de miR172 sobre los represores *AP2-like* y la caída en los niveles de *TEM* permite la activación de *FT* a través de CO – no mostrado en la figura- (o a través de las giberelinas). A su vez, la falta de *TEM* incrementa los niveles de *GAs* y con ellos la inducción floral, tanto en LD como en SD. El destacado en negrita identifica a los genes que se expresan a altos niveles en cada uno de los estados. Las flechas indican efecto positivo o activación, y las líneas acabadas en barra indican represión. El grosor de cada flecha/línea indica cómo es de fuerte el efecto. Para simplificar el esquema se han omitido ciertas regulaciones por retroalimentación.

## **OBJETIVOS**

Partiendo de la información previa que teníamos sobre TEM1 y TEM2, nos planteamos si éstos podrían estar relacionados con la ruta de control de la floración por la edad o con la regulación de la transición de la fase juvenil a la adulta, ambos procesos regulados por la acción de miR156/miR172 y por los factores de transcripción SPL.

Por tanto, decidimos abordar la posible relación entre TEM y la ruta de miR156/SPL/miR172, partiendo de dos hipótesis: (1) miR156/SPLs/miR172 controlan positiva o negativamente a TEM o bien, al contrario, (2) TEM controla positiva o negativamente a miR156/SPLs/miR172. En ambos casos, hemos estudiado cada componente por separado, analizando su relación concreta con los TEM.

La regulación esperada entre TEM y miR156 sería positiva, al ser ambos represores de la floración. Además, ambos se expresan durante la fase juvenil, por lo que queremos estudiar el papel de TEM en el control de la juvenilidad (en adelante, usaremos este término para referirnos a la duración de la fase juvenil). Por otra parte, la relación entre TEM y los SPLs o miR172 sería negativa, ya que estos promueven la floración y la transición a la fase adulta.

Los objetivos de este capítulo, por tanto, son estudiar las posibles relaciones entre:

- a) TEM y miR156
- b) TEM y SPLs
- c) TEM y miR172

Secundariamente, hemos introducido en el estudio a RAV1. Debido a la redundancia funcional de TEM1 y TEM2, hemos considerado oportuno analizar si RAV1 podría estar implicado también en estos procesos del desarrollo.

## RESULTADOS

La progresiva disminución en la expresión de los genes *TEM* a lo largo del desarrollo sugiere que debe existir una vía de regulación que controle este descenso de manera gradual. Nuestra primera hipótesis proponía que los genes involucrados en la ruta de control de la floración por la edad podrían regular a los genes *TEM* a lo largo del desarrollo, debido a la coincidencia del patrón de expresión entre *TEM* y miR156. Este miRNA u otros componentes de la ruta podrían afectar a la expresión de *TEM* directa o indirectamente. Aunque también sería posible que, al contrario, fueran los *TEM* quienes controlasen a estos componentes.

Las plantas que sobre-expresan miR156 o *TEM* presentan fenotipos similares de floración tardía y pérdida de dominancia apical, mientras que las plantas *35S::MIM156*, las *pSPL9::rSPL9* (resistentes a la acción de miR156) y las *35S::MIR172* presentan una floración temprana y un acortamiento de la fase juvenil, al igual que en los mutantes *tem*.

Para desvelar si los genes *TEM* están en la misma ruta de control de la juvenilidad o de la floración que miR156/miR172 y los factores SPL y, si es así, cómo es la regulación entre ellos, hemos realizado diversos experimentos de análisis de secuencias, análisis de expresión y análisis genéticos.

### 1. Búsqueda bioinformática de secuencias de unión entre miRNAs/SPLs y los genes TEM/RAV

La descripción de los sitios de unión para miRNAs, SPLs y los factores de transcripción de la familia RAV ha facilitado la búsqueda bioinformática de posibles genes diana para todos ellos, de manera que hemos analizado sus promotores, secuencias codificantes y reguladoras en busca de sitios de unión para miR156, miR172 y SPL en *TEM1*, *TEM2* y *RAV1*, y sitios de unión para los factores RAV en *MIR156*, *MIR172* y varios *SPL*.

#### 1.1 Estudio de los promotores de *TEM1*, *TEM2* y *RAV*

##### 1.1.1 Predicción de posibles sitios de unión para miRNAs

Inicialmente, analizamos las secuencias de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* mediante la base de datos miRBase para detectar posibles sitios de unión de miR156 y miR172 en los promotores, regiones codificantes y regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR), utilizando las secuencias conocidas de los diferentes miRNAs maduros (Tablas 1 y 2). A pesar de no haber detectado ninguna complementariedad de estos miRNAs con ninguno de los genes objeto de estudio, sí hemos encontrado otros posibles miRNAs complementarios a las secuencias de estos genes de la familia *RAV* (Tabla 3). La mayoría de los miRNAs que aparecen en la predicción no están descritos ni anotados en la base de datos de TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Además, teniendo en cuenta los valores de puntuación (*score*) y los

valores “E” obtenidos para cada miRNA analizado en los diferentes genes de la familia *RAV*, no podemos afirmar que ninguno de ellos regule a estos factores de transcripción.

Nuestro interés se centraba en identificar un posible sitio de regulación directa de alguno de los genes *TEM/RAV* por miR156 o miR172, y con los resultados obtenidos descartamos esa opción. Sin embargo, no descartamos que pueda existir una regulación indirecta.

<b>TEM1</b>				
MIR	Secuencia miRNA maduro	Score	E-valor	Función genes diana
miR774b	UGAGAUGAAGAUUUGGGUGAU	63	5,7	No descrito
miR776	UCUAAGUCUUCUUAUUGAUGUU	72	3,2	No descrito
miR830	UAACUAAUUUUGAGAAGAAGUG	68	6,8	No descrito
miR861	CCUUGGAGAAUAUGCGUCA	67	8,3	No descrito
miR5021	UGAGAAGAAGAAGAAGAAAA	67	6,4	No descrito
miR5025	ACUGUAUAUAUGUAAGUGACA	67	6,9	No descrito
miR5998a/b	ACAGUUUGUGUUUUGUUUUGU	71	3,0	No descrito
<b>TEM2</b>				
MIR	Secuencia miRNA maduro	Score	E-valor	Función genes diana
miR396b	UCCACAGCUUUCUUGAACUU	69	5,6	Proliferación celular/GRF
miR407	UUUAAAUCAUAUACUUUUGGU	68	6,8	No descrito
miR776	UCUAAGUCUUCUUAUUGAUGUU	64	4,7	No descrito
miR779.2	UGAUUGGAAUUUCGUUGACU	67	8,3	No descrito
miR828	UCUUGCUUAAAUGAGUAUCCA	69	5,6	Familia MYB-TAS4
miR857	UUUUGUAUGUUGAAGGUGUAU	67	8,3	Familia Laccase
miR861	CCUUGGAGAAUAUGCGUCA	63	5,7	No descrito
miR1886	UGAGAGAAGUGAGAUGAAAUC	62	6,9	No descrito
miR2112	CGCAAUUGCGGAUAUCAUGU	72	3,2	No descrito
<b>RAV1</b>				
MIR	Secuencia miRNA maduro	Score	E-valor	Función genes diana
miR400	UAUGAGAGUAUUUAAGUCAC	67	7,8	Orgánulos/PPR
miR407	UUUAAAUCAUAUACUUUUGGU	71	3,9	No descrito
miR865	AUGAAUUUGGAUCUAAUUGAG	68	6,9	No descrito
miR1888	UAAGUUAAGAUUUGUGAAGAA	64	9,0	No descrito
miR5657	UGGACAAGGUUAGAUUUGGUG	71	2,3	No descrito
miR5998a/b	ACAGUUUGUGUUUUGUUUUGU	67	8,4	No descrito

**Tabla 3. Predicción de posibles secuencias de unión de miRNAs a genes de la familia *RAV***

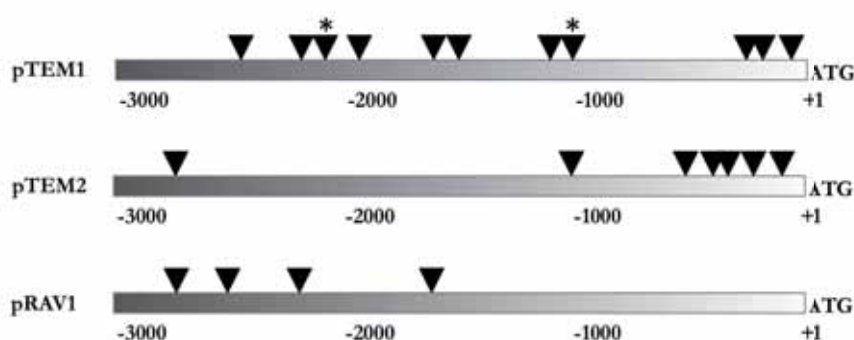
Se muestran los distintos miRNAs (nombre, secuencia del miRNA maduro y función) que podrían unirse por su complementariedad de secuencia a los genes de la familia *RAV*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1*. Los datos de *score* indican la puntuación del alineamiento y el valor E indica la probabilidad de que dicha unión se produzca al azar.

### 1.1.2 Predicción de posibles sitios de unión para SPLs

Los factores de transcripción SPL presentan un dominio de unión a DNA altamente conservado, denominado dominio SBP. El dominio SBP es capaz de reconocer los motivos de DNA que contienen el núcleo GTAC, cuya secuencia consenso es TXCGTACAA (Cardon et al., 1999), para regular a sus genes diana. Por tanto, al igual que hemos hecho para los miRNAs, analizamos los promotores, regiones codificantes y UTRs de los genes *TEM1*, *TEM2* y *RAV1*, en busca de cajas SBP. A continuación se muestran únicamente las regiones

promotora y 5' UTR de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* por ser las más ricas en secuencias GTAC (Fig. 10).

*TEM1* muestra un promotor rico en secuencias GTAC (11 en total) distribuidas a lo largo del promotor; las regiones codificante y 3'UTR presentan 3 y 2 cajas, respectivamente (datos no mostrados). *TEM2* presenta una zona altamente enriquecida en secuencias GTAC en la región más próxima al codón de iniciación ATG; tanto la región codificante como la 3' UTR presentan una única caja cada una (datos no mostrados). *RAV1*, por su parte, presenta menos cajas que los anteriores y más alejadas del ATG; la región codificante tiene un total de 3 cajas, y la 3'UTR solo una (datos no mostrados). Hay que destacar que únicamente *TEM1* presenta en su promotor dos cajas SBP completas (TCCGTACAA y TACGTACAA), el resto presentan sólo el núcleo GTAC.



**Figura 10. Análisis de posibles cajas de unión de SPL en los genes *TEM1*, *TEM2* y *RAV1***

La secuencia GTAC es reconocida por los factores de transcripción SPL. Los triángulos indican la posición de los posibles sitios de unión para SPL con núcleo GTAC. Los asteriscos indican las secuencias que coinciden con la secuencia consenso completa.

Aunque estos resultados *in silico* indican que podría existir una regulación de *TEM/RAV* por alguno de los factores SPL, este tipo de datos no nos indican qué SPL podría unirse. Dada la redundancia funcional de la familia y el elevado número de miembros, nos centraremos en testar únicamente dos de los SPL más representativos de los dos clados implicados en la floración y el control de la fase juvenil: SPL9 y SPL3.

En resumen, los resultados de la búsqueda *in silico* de secuencias de reconocimiento para miR156, miR172 y SPL en *TEM/RAV* indican que, si existe una regulación por miR156, ésta podría ser indirecta a través de los factores de transcripción SPL. Así mismo, estos resultados no sugieren que exista una regulación directa de *TEM/RAV1* por miR172.

## 1.2 Estudio de las secuencias de *MIR156*, *MIR172* y *SPL*

Como se ha descrito en la introducción general, los factores de transcripción de la familia RAV se unen a unas secuencias conocidas de DNA, por lo que hemos buscado estas secuencias en *MIR156*, varios genes *SPL* y *MIR172*. La secuencia consenso de unión a DNA descrita para RAV1 es C(A/C/G)ACA N2-8 (C/A/T)ACCTG (Kagaya et al., 1999). Esta secuencia parece aceptar cambios en ciertos nucleótidos, manteniendo su capacidad de unión (Osnato et al., 2012).

Hemos introducido la secuencia CVACA N2-8 XACCTG en la herramienta Fuzznuc de EMBOSS (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc>), la cual detecta patrones determinados en secuencias de DNA usando algoritmos de búsqueda. Después de establecer los parámetros de búsqueda y obtener las posibles secuencias para cada gen de interés, procedimos a realizar un análisis más detallado de las secuencias, descartando aquellos posibles patrones que se alejaban demasiado de la secuencia consenso. Hemos aceptado entre 1 y 2 "mismatches" respecto a la secuencia consenso y cierta variabilidad en la longitud de la secuencia situada entre los sitios de unión para los dominios AP2 y B3, lo que la hace menos estricta pero incrementa el número de falsos positivos. En cualquier caso, este primer análisis *in silico* nos facilita la búsqueda de dianas directas, pero siempre es necesaria una confirmación experimental posterior.

Gen	Secuencia posible unión RAV	Distancia ATG	Posición
At1g65480	<i>FT</i> CAACA cagagaaac CACCTG	-37	Promotor
At1g15550	<i>GA3ox1</i> CCACA ctctcaca TACCTG	+48	Exón
At1g80340	<i>GA3ox2</i> CCACTI ctcaaacc CACCTG	+48	Exón
At2g25095	<i>MIR156a</i> CAAGA gaag CAAGTG	+44	Stem-loop
	CA <del>C</del> CA cata ATCCTG	-933	Promotor?
At2g33810	<i>SPL3</i> CAACTI ctc GACCTG	+173	Exón
At1g53160	<i>SPL4</i> CAACA t TACCTG	-514	Promotor?
At3g15270	<i>SPL5</i> CAACA aggttg AGACTG	+67	Exón
At2g42200	<i>SPL9</i> CCACA tcaac CACATG	+1488	Exón
	CAACA acaaca TACATG	+1535	Exón
	CAACC ac CACCTG	+1596	Exón
At2g28056	<i>MIR172A</i> CA <del>C</del> CA ggtctt TCTCTG	+18	Exón
	CAACA aaacaaa GA <del>A</del> CTG	+1214	Intrón
At5g04275	<i>MIR172B</i> CCACA cttt CACCTG	-1062	Promotor?
	CAACA agttc ATACTG	-246	Promotor?
At3g11435	<i>MIR172C</i> CAGCA aacca TIACTG	-437	Promotor?
	CA <del>C</del> CA tt TIGCTG	+109	-
	CGGCA ccatt TIGCTG	+109	-
	CAACA gccaacag TAGCTG	+186	Stem-loop
	CAACA ca AACCTG	+332	-
At5g59505	<i>MIR172E</i> CA <del>C</del> CA aaatcatc TIGCTG	+214	-

**Tabla 4. Resumen de los posibles sitios de unión RAV en los genes *MIR156*, *SPL* y *MIR172***  
 Identificación de los posibles sitios de unión de proteínas de la familia RAV, acorde con la secuencia consenso publicada para RAV1. Se incluye la información de la posición en el gen. Los sitios de unión confirmados experimentalmente en las plantas *35S::TEM1* mediante ChIP-qPCR son los de *FT*, *GA3ox1/GA3ox2*. Los nucleótidos subrayados indican los cambios respecto a la secuencia consenso.



Según los resultados *in silico*, todos ellos tienen posibles dianas de unión para alguno de los miembros de la familia RAV (Tabla 4). Encontramos dos posibles sitios de unión en el gen *MIR156A*, unos de ellos con tres cambios nucleotídicos, y otro más conservado. El análisis de los genes *SPL* se ha acotado a cuatro de ellos (*SPL3*, *SPL4*, *SPL5* y *SPL9*), por ser los más directamente relacionados con las rutas de control de la juvenilidad y la floración por la edad. Para *SPL3*, *SPL4* y *SPL5* se muestran únicamente las secuencias más probables (las que incluyen un menor número de cambios), y para *SPL9* se muestran las que posteriormente se han testado mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de PCR cuantitativa (ChIP-qPCR). En los genes *MIR172* encontramos posibles sitios de unión en cuatro de los cinco genes que componen la familia, con la excepción de *MIR172D*, y una elevada presencia en *MIR172C*, para el cual también se ha testado la unión mediante ensayos de ChIP-qPCR.

Estos resultados sugieren que TEM/RAV podrían regular directamente a algunos de los genes más importantes de la ruta de la edad que controla la juvenilidad y la floración.

## **2. Relación entre TEM/RAV1 y miR156**

miR156 se expresa durante las primeras etapas del desarrollo para mantener la fase juvenil y evitar una floración precoz. *TEM1* y *TEM2* se expresan en el mismo momento y su descenso es necesario para permitir la floración. Por tanto, es razonable pensar que podría existir una regulación positiva entre estos elementos en el control de la floración y de la duración de la fase juvenil. Nuestro objetivo en este primer apartado es analizar si los TEM están implicados en la misma ruta que miR156, ya sea por regulación indirecta de los TEM por miR156, o porque sean ellos quienes induzcan a este miRNA.

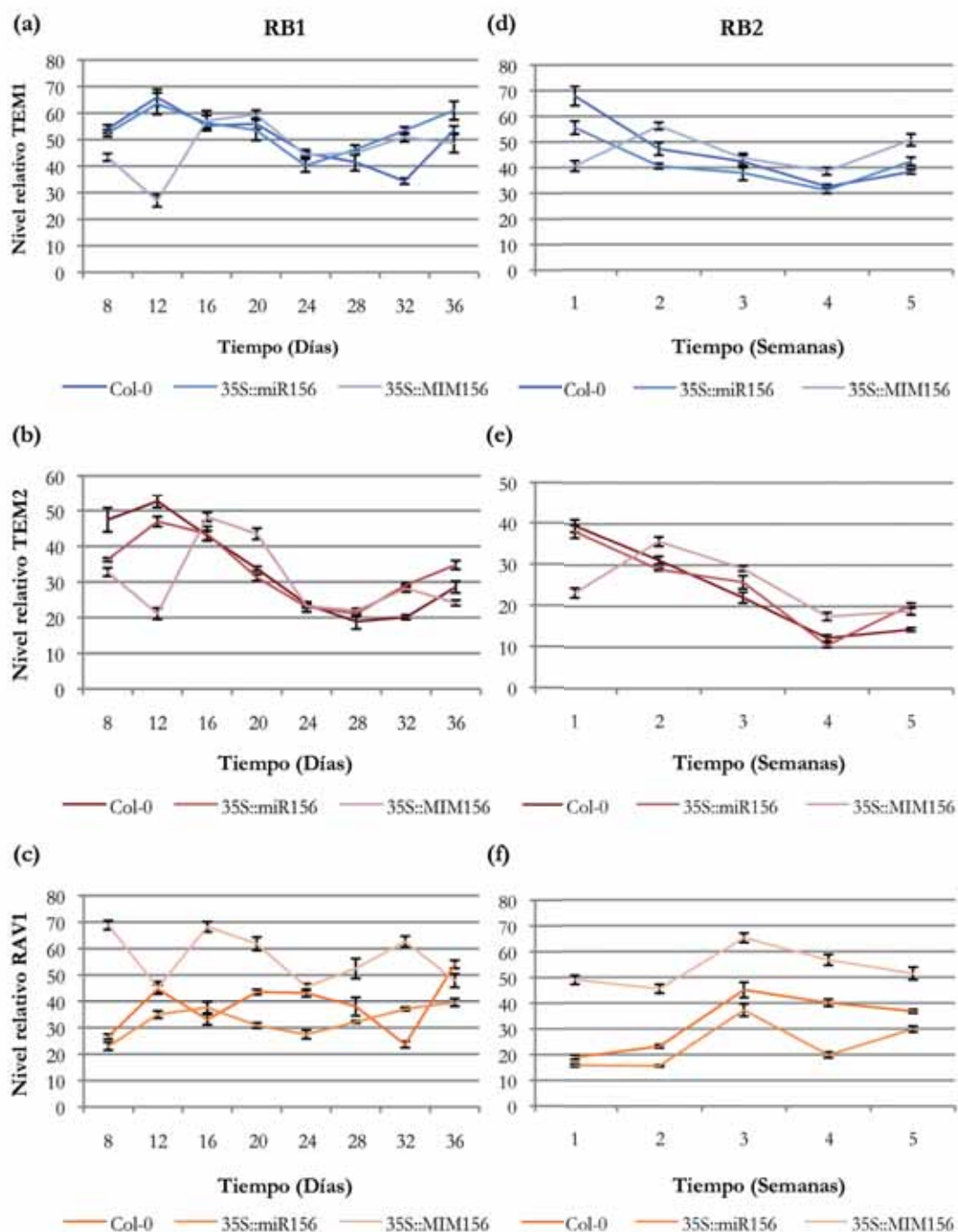
### **2.1 Regulación de la expresión de TEM/RAV en plantas 35S::MIR156 y 35S::MIM156**

A pesar de que *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* no tienen sitios de unión para miR156, decidimos comprobar si este miRNA regula a dichos genes de forma indirecta.

Dado que en día corto las plantas crecen más lentamente, con cambios de fase más separados en el tiempo, consideramos una buena opción analizar la expresión de los genes *TEM/RAV* en las plantas *35S::MIR156*, *35S::MIM156* y plantas silvestres en este fotoperiodo. Para este estudio recogimos muestras regularmente a lo largo de 5 semanas, y realizamos un análisis cuantitativo para comparar los niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* (Fig. 8).

Los resultados de dos experimentos independientes nos indican que no parece haber cambios significativos en los niveles de expresión de *TEM1* y *TEM2* ni en las plantas *35S::MIR156* ni en las *35S::MIM156*. En ambos casos los niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* caen a lo largo del desarrollo, alcanzando sus valores mínimos alrededor de la semana

4 (días 24-28), prácticamente igual que en las plantas silvestres (días 28-32), por lo que no parece probable que miR156 regule de forma indirecta la transcripción de *TEM1* o *TEM2* para promover su descenso a lo largo del desarrollo.



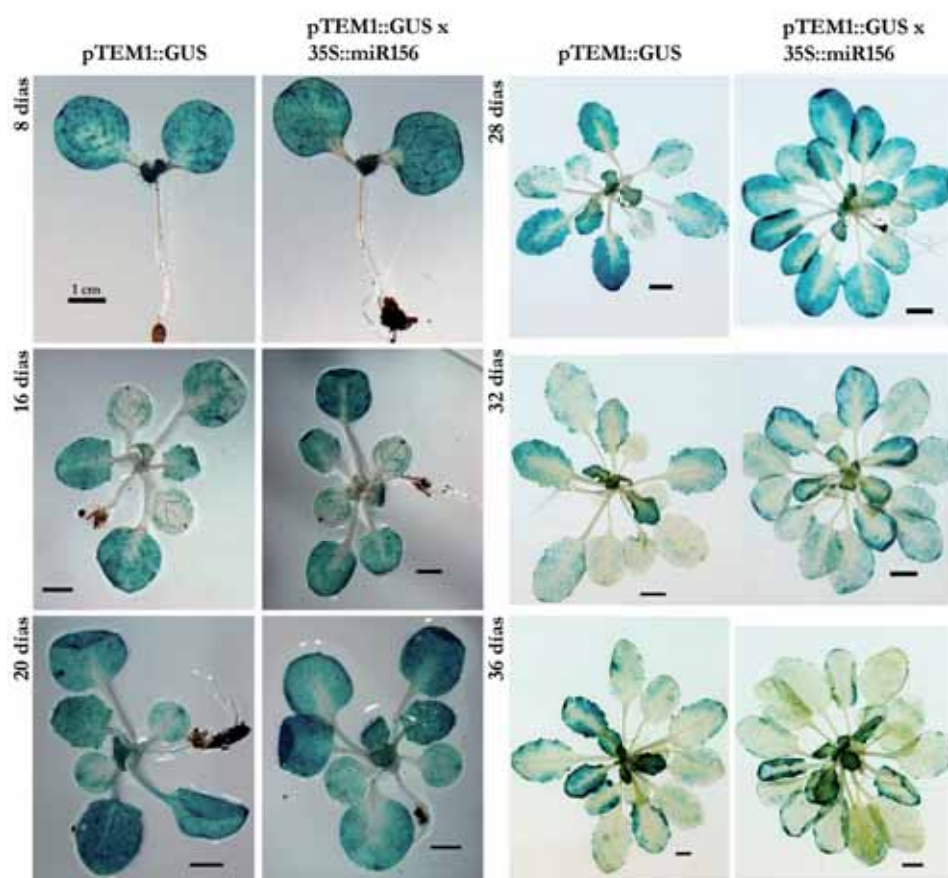
**Figura 11. Niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres, *35S::MIR156* y *35S::MIM156***

La expresión de *TEM1* (a,d) y *TEM2* (b,e) no parece estar controlada por miR156 a lo largo del desarrollo, pero *RAV1* (c,f) sí parece estar regulado negativamente por miR156. Las plantas han crecido en tierra, en un fotoperiodo de día corto a 22°C en cámaras con condiciones controladas. Las muestras se han recogido a ZT12, coincidiendo con el pico de expresión de *TEM1* y *TEM2*. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Se muestran dos experimentos independientes, el RB1 (a-c) está representado en días y el RB2 (d-f) está representado en semanas; en ambos casos, las muestras

se han recogido cada 4 días durante 5 semanas. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

El patrón de expresión de *RAV1* en plantas silvestres es bastante homogéneo a lo largo del desarrollo, con valores relativamente más altos durante los días 20-28 (lo que se corresponde con las semanas 3-4). Otra diferencia respecto a los genes *TEM* es el claro incremento que se observa en las plantas *35S::MIM156* en la mayoría de los puntos analizados, y en sentido opuesto en las plantas *35S::MIR156*, con unos valores ligeramente más bajos que los silvestres o similares. Por tanto, miR156 regula de forma negativa a *RAV1*. Estos datos nos pueden ayudar a conjeturar, por primera vez, sobre una posible implicación de *RAV1* en las rutas de floración o juvenilidad mediadas por miR156.

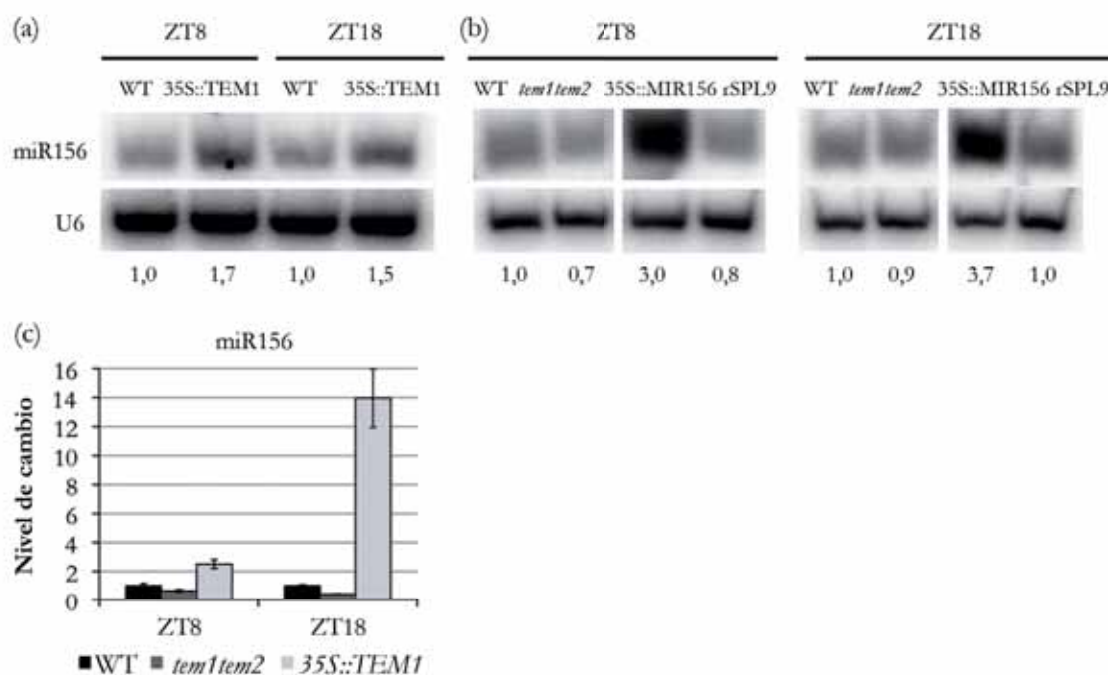
En paralelo, analizamos la expresión de *pTEM1::GUS* a lo largo de 5 semanas en las plantas *35S::MIR156*, en las mismas condiciones en que se habían realizado los experimentos de análisis cuantitativo de la expresión anteriormente mostrados. Los resultados obtenidos (Fig. 12) nos confirman los resultados obtenidos por RT-qPCR. A pesar de no haber realizado una cuantificación de la actividad GUS, no se observan diferencias apreciables que sugieran que miR156 tenga un efecto claro sobre la expresión de *TEM1*, tampoco en relación con su distribución espacial.



**Figura 12. Ensayo de tinción histoquímica de GUS en plantas *pTEM1::GUS 35S::MIR156***  
Las plantas fueron cultivadas en tierra, en SD, durante 5 semanas.

## 2.2 Regulación de la acumulación de miR156 por la acción de TEM

Después de analizar los resultados anteriores, concluimos que era poco probable que miR156 determinase la reducción de los niveles de *TEM* a lo largo del desarrollo, por lo que estudiamos la posible relación inversa, si *TEM* podría controlar positivamente a miR156 como una señal endógena de la edad de la planta para retrasar la floración y mantener la fase juvenil. Para ello, utilizamos plantas *35S::TEM1* y *tem1 tem2* cultivadas durante 10 días en LD. Las muestras se recogieron a ZT8 y ZT18, durante el periodo de luz y oscuridad, respectivamente, para así estudiar el efecto de la sobre-expresión de *TEM* cuando normalmente no se expresa (ZT8) o de la falta de *TEM* cuando debería expresarse (ZT18).



**Figura 13. Análisis de la acumulación de miR156 en plantas silvestres, *tem1 tem2* y *35S::TEM1***

Las plantas se cultivaron en tierra durante 10 días, en LD, y se recogieron a ZT8 y ZT18. Las plantas silvestres (WT) son Col-0. (a, b) Análisis mediante *Northern blot* utilizando una sonda complementaria a miR156. Se utilizó el snRNA U6 como control de la cantidad de RNA total de cada muestra. Los números bajo los *blots* indican el cambio en el nivel de miR156 respecto al tipo silvestre, después de normalizar los niveles utilizando los valores del snRNA U6. (c) Análisis mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 5S como control. Las barras de error muestran la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Se muestran los resultados de un experimento representativo de al menos dos experimentos independientes.

Los análisis de los niveles de miR156 se realizaron inicialmente mediante RT-qPCR y posteriormente se comprobaron por *Northern blot*. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Paula Suárez López, de nuestro grupo.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la expresión de miR156 está incrementada en las plantas *35S::TEM1*, respecto a los valores de las plantas silvestres, tanto

a ZT8 como a ZT18 (Fig. 10a,c). En el doble mutante *tem1 tem2* podemos observar una ligera reducción del nivel de miR156 (Fig. 10b,c).

Estos datos confirman que existe una regulación positiva de miR156 por TEM1, sin embargo no aclara si la regulación es directa o indirecta. Para ello, estamos trabajando en la realización de un experimento de ChIP-qPCR que confirme la unión de TEM1 a *MIR156a* en las regiones con posibles sitios de unión RAV mostrados en la tabla 4.

Hay que señalar una diferencia experimental entre los experimentos mostrados en este apartado con respecto a los del apartado anterior (2.1). En el primer caso hemos trabajado en SD (para favorecer la detección de cambios a lo largo de un periodo de desarrollo más prolongado en el tiempo), mientras que la cuantificación de los cambios de miR156 en las plantas mutantes o sobre-expresantes de *TEM* se ha realizado en LD. En ambos fotoperiodos actúan miR156 y TEM, y ya que otros componentes de la ruta de la edad convergen con reguladores de la ruta del fotoperiodo, como miR172, decidimos explorar ambas condiciones experimentales.

### 3. Relación entre TEM/RAV1 y SPL

Después de comprobar que *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* tienen cajas SBP en sus promotores y secuencias codificantes, y que *SPL9* tiene varios posibles sitios de unión para los factores RAV procedimos a testar una posible interacción entre ellos.

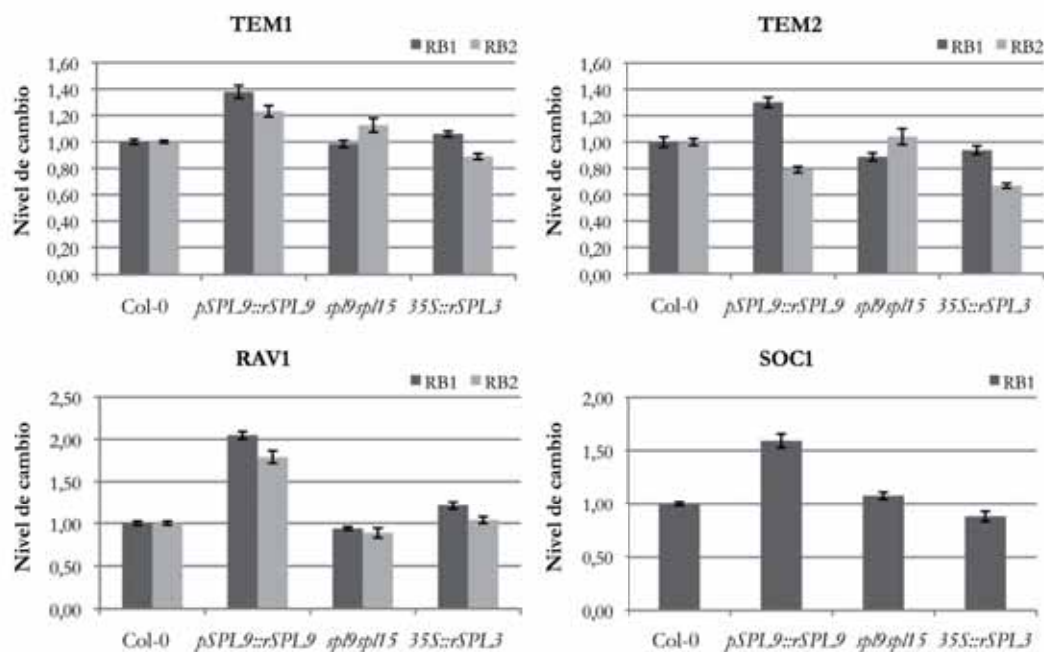
Primeramente, analizamos la acumulación de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en las plantas *pSPL9::rSPL9*, *spl9 spl15* y *35S::rSPL3* en SD. A continuación, analizamos la expresión de *SPL9* en las plantas *tem1 tem2* y *35S::TEM1* en LD.

#### 3.1 Regulación de la expresión de TEM/RAV por SPLs

En las plantas silvestres, *SPL9* empieza acumularse a partir de la semana 3-4, coincidiendo con una disminución de los niveles de miR156, en SD (Wang et al., 2009), igual que ocurre con *SPL3*, también en SD (Wu & Poethig, 2006). Las plantas *pSPL9::rSPL9* son resistentes a la acción de este miRNA y, por tanto, pueden expresar SPL9 en momentos del desarrollo en que éste estaría silenciado en las plantas silvestres, por ejemplo, durante las etapas tempranas. Las plantas *35S::rSPL3* presentan una expresión constitutiva de una versión de SPL3 también resistente a la acción de miR156 (Wang et al., 2003; Wu et al., 2009).

Para analizar la expresión de nuestros genes de interés en estos genotipos, se cultivaron plantas durante dos semanas en SD, y se recogieron muestras a ZT12. Como control positivo se analizó la expresión de *SOC1*, gen diana directo de SPL9 (Wang et al., 2009). Los resultados obtenidos nos confirman que la activación prematura de *SPL9* en etapas tempranas del desarrollo conlleva una activación de *SOC1* (Fig. 14). Observamos un incremento de un 60% en las plantas *pSPL9::rSPL9*, aunque no se observa un cambio

destacable en las plantas *sp19 sp15* ni en las *35S::rSPL3*. Los datos de expresión de nuestros genes de interés en las plantas *pSPL9::rSPL9* nos indican que parece haber un ligero incremento de *TEM1* (aproximadamente un 30%) y un claro incremento de *RAV1* (aproximadamente un 90%), pero sin cambios significativos en *TEM2* (Fig. 14). En cuanto a las plantas *sp19 sp15* y *35S::rSPL3* apenas se observan cambios destacables en *TEM/RAV1*. Por tanto, no podemos concluir con seguridad que *SPL9* (ni *SPL3*) regule a ninguno de los genes *TEM/RAV* en las plantas WT.



**Figura 14. Niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2*, *RAV1* y *SOC1* en plantas silvestres, *pSPL9::rSPL9*, *sp19 sp15* y *35S::SPL3***

Las plantas han crecido en tierra durante 2 semanas, en un fotoperiodo de SD a 22°C. Las muestras se han recogido a ZT12, coincidiendo con el pico de expresión de *TEM1* y *TEM2*. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Se muestran dos experimentos independientes (RB1 y RB2). Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

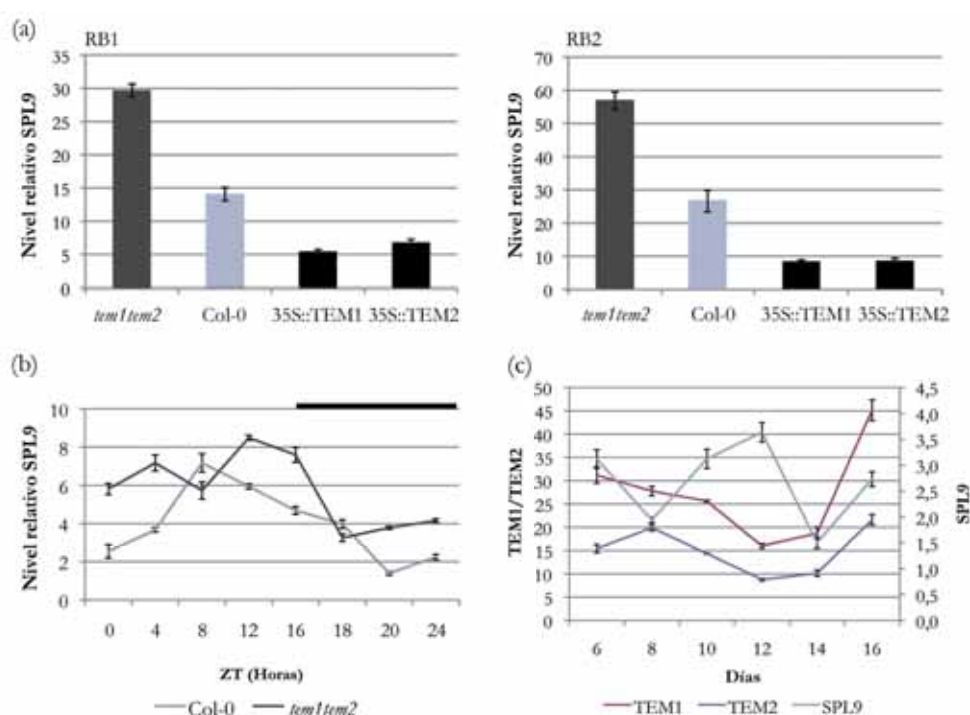
### 3.2 Regulación de la expresión de *SPL9* por *TEM*

Por otro lado, analizamos la expresión de *SPL9* en las plantas silvestres a lo largo de las 24 horas y a lo largo del desarrollo entre los días 6 a 16 y en las plantas *tem1 tem2* y *35S::TEM1*, en LD (Fig. 15).

En las plantas *tem1 tem2*, el mRNA de *SPL9* está claramente incrementado, en torno al doble que en las plantas silvestres (Col-0). Por el contrario, en las plantas *35S::TEM1* y *35S::TEM2*, *SPL9* muestra una clara disminución de sus niveles de mRNA, mayor del 50%, en ambos experimentos (Fig. 15a). Estos resultados han sido obtenidos en colaboración con otro miembro del grupo, el Dr. Luis Matías-Hernández.



Los datos obtenidos en el análisis realizado a lo largo de 24 horas en las plantas silvestres y el doble mutante *tem1 tem2* (Fig. 15b), confirman el resultado anterior de la inducción de la expresión de *SPL9* por la falta de los represores TEM. Como se puede ver, los niveles de *SPL9* son mayores en las plantas *tem1 tem2* que en las silvestres en prácticamente todos los puntos analizados, especialmente durante las primeras horas de la mañana, alrededor de las últimas horas de la tarde y en la transición de la luz a la oscuridad. En cuanto a su expresión a lo largo del desarrollo en las plantas silvestres (Fig. 15c), *SPL9* alcanza su nivel máximo coincidiendo con los niveles mínimos de *TEM1* y *TEM2* en LD (días 12-14), lo que sugiere que la caída en los niveles de *TEM* podría ser necesaria para promover la activación de *SPL9* en la etapa adulta.

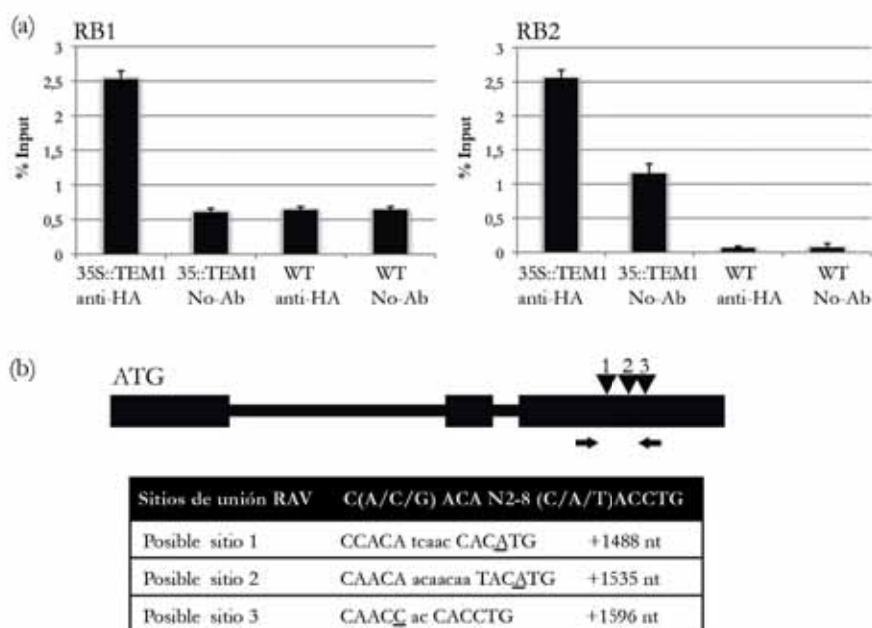


**Figura 15. Niveles de mRNA de *SPL9* en plantas silvestres, *tem1 tem2* y sobre-expresantes de *TEM1* y *TEM2***

Las plantas fueron cultivadas en LD (a) Expresión a día 11; las muestras fueron recogidas a ZT18. Se muestran dos experimentos independientes (RB1 y RB2) (b) Expresión a lo largo de 24 horas de plantas silvestres y *tem1 tem2* de 9 días; las muestras se recogieron cada 4 horas, y se añadió el punto extra de ZT18. La barra superior indica el período nocturno. (c) Expresión a lo largo del desarrollo, entre los días 6 y 16; las muestras se recogieron cada 2 días a ZT18. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

En conjunto, todos estos datos sugieren que *TEM1* y *TEM2* controlan los niveles de mRNA de *SPL9* y lo reprimen en etapas tempranas del desarrollo, evitando así un cambio de fase prematuro. Además, la caída en los niveles de *TEM* a lo largo del desarrollo podría ser necesaria para que se produzca la inducción de *SPL9*.

Después de comprobar que *SPL9* tiene posibles sitios de unión para TEM/RAV (Tabla 4) y que además tiene afectada su expresión en las plantas sobre-expresantes y mutantes de *TEM* (Fig. 15), analizamos si la regulación de *SPL9* por estos factores de transcripción es directa o indirecta, mediante ensayos de ChIP-qPCR (Fig. 16a). La secuencia de *SPL9* contiene 3 posibles sitios de unión para proteínas de la familia RAV. Todos los sitios se encuentran en la región codificante, cercana a la región 3'UTR (Fig. 16b) y están bastante conservados respecto a la secuencia consenso de unión de RAV1 previamente publicada (Kagaya et al., 1999).



**Figura 16. Análisis de la unión de TEM1 a *SPL9* mediante ChIP-qPCR**

(a) Resultados de dos experimentos independientes (RB1 y RB2) que muestran el enriquecimiento de la cromatina en la fracción que contiene los posibles sitios de unión para RAV, observado en la cromatina de las plantas *35S::TEM1-HA* inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-HA, respecto a las plantas control (*35S::TEM1-HA* sin anticuerpo (No Ab) y plantas silvestres, con y sin anticuerpo). (b) Esquema de la región codificante de *SPL9*, en la que se detallan las posiciones (triángulos 1, 2 y 3) y las secuencias de los sitios de unión para RAV testados mediante el ensayo de ChIP-qPCR; las flechas indican la posición de los oligonucleótidos usados para la amplificación mediante qPCR. Las plantas silvestres Col-0 (WT) y *35S::TEM1* fueron cultivadas en tierra, en LD durante 11 días. Las muestras se han recogido a ZT18. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

Para este experimento de ChIP se cultivaron plantas silvestres Col-0 y *35S::TEM1* durante 11 días en tierra, en LD. Este momento del desarrollo nos pareció adecuado para testar la posible represión directa de *SPL9* por TEM1 en etapas tempranas. Se usaron plantas que sobre-expresan la proteína TEM1 fusionada a un epítipo HA (*35S::TEM1-3xHA*) y un anticuerpo anti-HA para inmunoprecipitar TEM1. Los experimentos de ChIP han sido realizados en colaboración con el Dr. Luis Matías-Hernández.



Los resultados de dos experimentos independientes indican que existe un enriquecimiento significativo de la región de *SPL9* donde se encuentran los posibles sitios de unión para proteínas de la familia RAV (Fig. 16), lo que sugiere que TEM1 se une a ellos directamente para reprimir la expresión de *SPL9* (Fig. 15a).

Por tanto podemos concluir que TEM1 reprime a *SPL9* y lo hace de manera directa en LD y etapas tempranas del desarrollo.

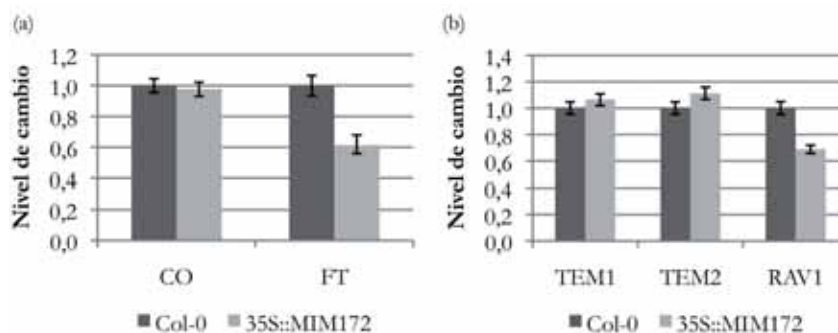
#### **4. Relación entre TEM/RAV1 y miR172**

Como hemos descrito anteriormente, *SPL9* induce la expresión de miR172b, y TEM parece regular negativamente a *SPL9*, por lo que esperamos que al menos haya un efecto indirecto de TEM sobre miR172, debido a la regulación de *SPL9* por los TEM. Por otra parte, aunque los genes *TEM* no presentan secuencias de unión para miR172, esto no excluye que este miRNA pueda regularlos indirectamente.

##### **4.1 Regulación de la expresión de TEM/RAV en plantas 35S::MIM172**

Analizamos los niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* en plantas *35S::MIM172* en condiciones de LD, donde muestran un fenotipo muy claro de floración tardía, cultivadas durante 10 días. Decidimos recoger las muestras a ZT10, momento en que los genes *TEM* muestran niveles bajos de expresión (aunque detectables por RT-qPCR) y *RAV1* niveles altos, para comprobar si en este momento la expresión de *TEM* era más alta, y la de *RAV1* más baja, en las plantas *35S::MIM172* respecto a las silvestres, tal y como esperaríamos si miR172 controlase sus niveles de expresión. Como controles positivos, analizamos la expresión de *CO* y *FT*, ya que los niveles de *FT* son más bajos en plantas *35S::MIM172* respecto al tipo silvestre, con independencia de los valores de expresión de *CO* (Jung et al., 2007) (Fig. 17a). Los resultados obtenidos para *TEM1* y *TEM2* sugieren que éstos no están afectados por el silenciamiento de miR172; los niveles de sus mRNAs son muy similares a los que presentan las plantas silvestres y no parece que el cambio sea significativo (Fig. 17b). Sin embargo, *RAV1* sí muestra un cambio más evidente, con una reducción de su expresión respecto a su valor silvestre. Si bien es cierto que la mayoría de los genes diana de miR172 no presentan cambios de acumulación de sus transcritos en plantas *35S::MIR172*, debido a que su silenciamiento ocurre principalmente por bloqueo de la traducción, también es cierto que ninguno de los *TEM/RAV* presenta dianas para este miRNA, por lo que no es probable que estén directamente regulados por el miRNA.

En conclusión, no parece que miR172 regule transcripcionalmente los niveles de mRNA de *TEM1* ni de *TEM2*, pero sí parece regular de manera indirecta y positiva los de *RAV1*.

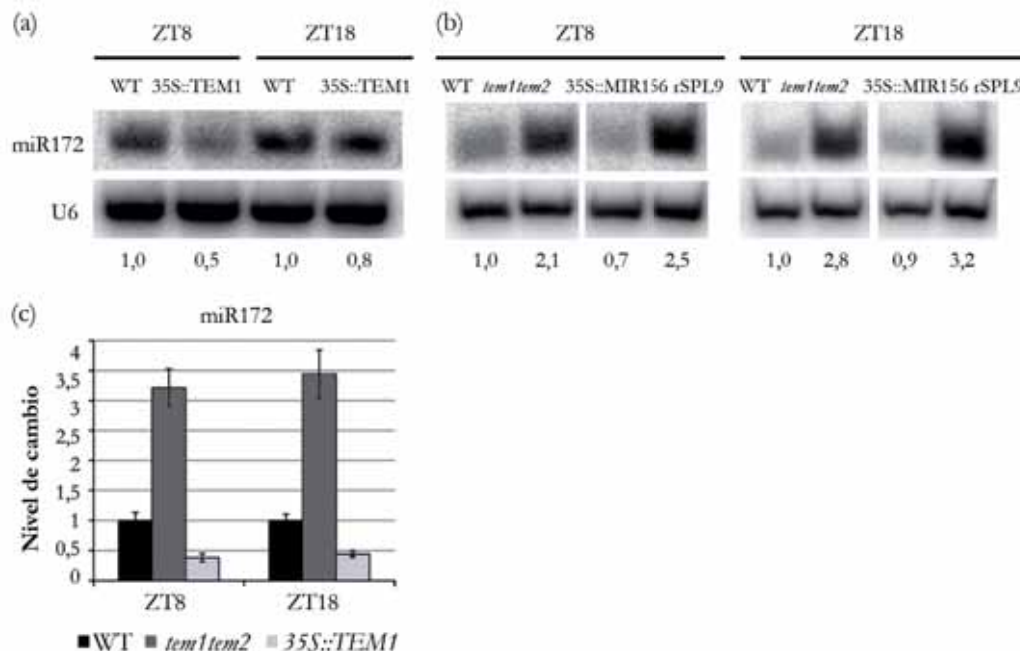


**Figura 17. Niveles de mRNA de los genes *CO/FT* y *TEM/RAV* en plantas silvestres y *35S::MIM172***

Análisis de expresión de (a) *CO*, *FT* y (b) *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres (Col-0) y *35S::MIM172*, cultivadas en placa con medio MS 1% en condiciones de LD durante 10 días y recogidas a ZT10. Se muestran los resultados de un experimento. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

#### 4.2 Regulación de la acumulación de miR172 por la acción de TEM

Partiendo de las mismas muestras utilizadas en el experimento de análisis de expresión de los niveles de miR156 (Fig. 10), se analizaron los niveles de miR172 siguiendo el mismo procedimiento, es decir su cuantificación mediante dos métodos independientes, RT-qPCR y *Northern blot* (Fig. 18).

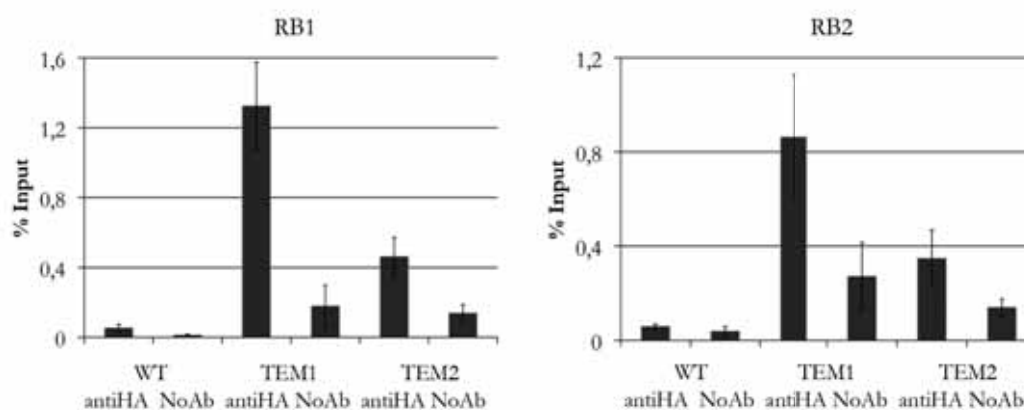


**Figura 18. Acumulación de miR172 en plantas silvestres, *tem1 tem2* y *35S::TEM1***

(a) Análisis mediante *Northern blot*. Se utilizó el snRNA U6 como control de la cantidad de RNA total de cada muestra. (b) Análisis mediante RT-qPCR. Los valores se normalizaron utilizando el rRNA 5S como control. Las barras de error muestran la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Las plantas se cultivaron en tierra durante 10 días y se recogieron a ZT8 y ZT18. Las plantas silvestres (WT) son Col-0.

La expresión de miR172 es considerablemente más baja en plantas *35S::TEM1*, reduciendo sus niveles prácticamente a la mitad (Fig. 18a,c). Además, podemos observar un claro incremento del nivel de miR172 en las plantas doble mutantes *tem1 tem2*, entre 2-3 veces superior (Fig. 18b). Comparando este incremento con los valores obtenidos en las plantas *pSPL9::rSPL9*, vemos que el efecto sobre los niveles de miR172 es muy similar. En ambos casos, el efecto es muy claro a ZT8 y ZT18. Estos datos confirman una regulación negativa de TEM1 sobre miR172.

Para establecer si la relación es directa o indirecta, hemos realizado un experimento de ChIP-qPCR en las mismas condiciones en que hemos realizado los experimentos de expresión, es decir en plantas de 10 días, recogidas a ZT18. Los resultados obtenidos en dos resultados independientes confirman la unión directa de TEM1 a *MIR172C* en las regiones identificadas con posibles sitios de unión RAV (Tabla 4), con un claro enriquecimiento de TEM1 y no de TEM2 a *MIR172C* (Fig. 19).



### Figura 19. Análisis de la unión de TEM1 y TEM2 a *MIR172C* mediante ChIP-qPCR

Se muestran dos experimentos independientes del enriquecimiento de la fracción de cromatina que contiene los posibles sitios de unión para RAV, observado en plantas *35S::TEM1-HA* y *35S::TEM2-HA* con anticuerpo anti-HA respecto a las plantas control (*35S::TEM1-HA* y *35S::TEM2-HA* sin anticuerpo (No Ab), y plantas silvestres, con y sin anticuerpo). Las plantas silvestres son Col-0. Las plantas WT, *35S::TEM-HA* y *35S::TEM2-HA* han sido cultivadas en tierra, en condiciones de LD durante 10 días. Las muestras se han recogido a ZT18. Las barras de error representan la desviación estándar de 2 réplicas técnicas.

Tomando en conjunto todos los experimentos de análisis de expresión realizados, los datos obtenidos sugieren que TEM1 podría activar, probablemente de manera indirecta, la expresión de miR156, y reprimir directamente a *SPL9* y miR172 para regular a los diferentes puntos de control del tiempo de floración mediado por la edad.

## **5. Estudios fenotípicos de tiempo de floración, duración de las fases juvenil y adulta y velocidad de producción de hojas**

Para comprobar si los cambios de expresión observados en las distintas plantas mutantes y sobre-expresantes con los que hemos trabajado tienen relevancia biológica y relación con los procesos que nos hemos planteado estudiar, realizamos diversos análisis fenotípicos. En concreto, hemos analizado el tiempo de floración, la duración de las fases juvenil y adulta (a través de la medida de la aparición de tricomas abaxiales) y otro carácter que también está regulado por los mismos factores que forman parte de la ruta de la floración mediada por la edad: la velocidad de producción de hojas. La tabla 11 resume los fenotipos observados.

Los análisis de tiempo de floración y de juvenilidad (número de hojas jóvenes/número hojas adultas) se han realizado en las mismas plantas, lo que nos ha permitido efectuar un seguimiento del desarrollo de las distintas fases en los mismos individuos. Ambos análisis nos han aportado información complementaria que nos ha permitido realizar comparaciones entre plantas mutantes y sobre-expresantes de *TEM/RAV* y los datos publicados de plantas alteradas en la ruta de la edad. Como se ha comentado en la introducción, las plantas *35S::MIR156*, *sp19 sp15* y *35S::MIM172* florecen tarde y tienen la fase juvenil extendida respecto a las plantas silvestres, es decir producen más hojas juveniles antes de florecer. Además, las plantas *35S::MIR156* y *sp19 sp15* tienen una velocidad de producción de hojas más rápida que las plantas silvestres (Franco-Zorrilla et al., 2007; Mathieu et al., 2009; Schwarz et al., 2008; Wu & Poethig, 2006; Wu et al., 2009).

Los análisis de tiempo de floración y duración de las fases de desarrollo se han efectuado en condiciones de SD y LD, mientras que la velocidad de producción de hojas se ha cuantificado únicamente en condiciones de SD.

### **5.1 Tiempo de floración**

Los datos de análisis del tiempo de floración obtenidos en condiciones de SD se han determinado teniendo en cuenta tanto el número de hojas como el número de días (Tabla 5).

Los resultados indican que todos los mutantes *tem* (sencillos y doble mutante *tem1 tem2*) florecen temprano en comparación con las plantas silvestres (Tabla 5, Osnato et al., 2012).

Los datos obtenidos para el mutante *rav1* sugieren que podría ser ligeramente temprano en número de hojas, pero no en cuanto al número de días. Sin embargo, otros datos obtenidos en el laboratorio recientemente, muestran una menor diferencia respecto a las plantas WT (datos no mostrados), por lo que no está claro que tengan afectado el tiempo de floración. Por su parte, las plantas *35S::TEM1* no florecieron después de 3 meses en SD. Estas plantas siguen normalmente sin florecer pasados 5 meses en estas condiciones (Osnato et al., 2012).

Genotipo	Tiempo de floración		Tiempo de floración		
	Fenotipo	Totales <sup>a</sup> ± SD <sup>b</sup>	Fenotipo	Días <sup>c</sup> ± SD	Semanas <sup>d</sup>
<b>Experimento 1</b>					
Col-0	WT	64,6 ± 4,1	WT	62,4 ± 2,1	8-9
<i>tem1-1tem2-2</i>	Temprano	18,8 ± 3,7	Temprano	29,8 ± 3,9	4-5
<i>rav1-1</i>	Temprano	55,9 ± 1,7	Temprano	57,1 ± 1,8	8-9
<i>35S::TEM1</i>	Tardío	NV <sup>e</sup>	Tardío	NQ	-
<i>35S::MIR156</i>	Tardío	105,2 ± 6,3	Tardío	81,2 ± 3,9	11-12
<i>35S::MIM156</i>	Temprano	54,9 ± 5,3	Tardío	74,4 ± 2,9	10-11
<i>pSPL9::rSPL9</i>	Temprano	53,3 ± 3,2	Tardío	77,2 ± 3,3	11-12
<i>spl9-2spl15-2</i>	Tardío	75,7 ± 2,3	Tardío	72,3 ± 2,1	10-11
<b>Experimento 2</b>					
Col-0	WT	70,9 ± 3,9	WT	66,7 ± 1,9	9-10
<i>tem1-1</i>	Temprano	61,9 ± 4,6	Temprano	63,0 ± 3,8	9
<i>tem1-1tem2-2</i>	Temprano	29,6 ± 6,0	Temprano	37,3 ± 2,8	5-6
<i>rav1-1</i>	Temprano	62,6 ± 3,0	WT	65,4 ± 2,1	9-10
<i>35S::TEM1</i>	Tardío	NV	Tardío	NQ	-
<i>35S::MIR156</i>	Tardío	103,3 ± 3,9	Tardío	84,6 ± 5,3	12-13
<i>35S::MIM156</i>	Temprano	57,4 ± 7,7	Tardío	76,2 ± 4,6	10-11
<i>pSPL9::rSPL9</i>	Temprano	55,3 ± 1,8	Tardío	78,0 ± 5,6	11-12
<i>spl9-2spl15-2</i>	Tardío	83,2 ± 5,9	Tardío	76,2 ± 4,2	10-11
<i>35S::MIM172</i>	Tardío	82,5 ± 3,4	Tardío	80,0 ± 3,0	11-12
<b>Experimento 3</b>					
Col-0	WT	73,4 ± 3,0	WT	69,5 ± 2,1	9-10
<i>tem1-1</i>	Temprano	61,8 ± 6,4	Temprano	58,1 ± 3,0	8-9
<i>tem2-2</i>	Temprano	55,1 ± 4,4	Temprano	52,6 ± 2,9	7-8
<i>tem1-1tem2-2</i>	Temprano	36,5 ± 5,6	Temprano	41,7 ± 4,4	5-6
<b>Experimento 4</b>					
Col-0	WT	66,0 ± 4,4	WT	64,9 ± 1,0	9-10
<i>tem1-1</i>	Temprano	56,7 ± 5,3	Temprano	55,7 ± 4,2	7-8
<i>tem2-2</i>	Temprano	41,4 ± 3,9	Temprano	50,0 ± 2,3	7-8
<i>tem1-1tem2-2</i>	Temprano	31,0 ± 3,6	Temprano	38,1 ± 2,1	5-6

**Tabla 5. Análisis del tiempo de floración en condiciones de SD**

Se muestra el número total de hojas (TLN) y el número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista. Se muestran 4 experimentos independientes. <sup>a</sup>Totales: Número de hojas totales, <sup>b</sup>SD: Desviación estándar, <sup>c</sup>Días: es visible el botón floral a simple vista, <sup>d</sup>W: Semanas; <sup>e</sup>NV: No visible después de 3 meses, <sup>f</sup>NQ: No cuantificable. WT (wild-type) plantas silvestres. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 10 y 15 plantas por genotipo. La significación estadística de estos datos se ha realizado mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Bonferri; la significación obtenida en cada comparación se muestra en el anexo (Anexo – Tabla 5).

Comparando estos fenotipos con los de las plantas *35S::MIR156*, *35S::MIM156*, *pSPL9::rSPL9*, *spl9 spl15* y *35S::MIM172* observamos que las plantas *35S::TEM1* son las más tardías tanto en número de hojas como en número de días. Las plantas *35S::MIR156*, *spl9 spl15* y *35S::MIM172* florecen con 75-100 hojas totales y después de 70-80 días, por lo que son tardías en cuanto al número de hojas y de días respecto a las plantas silvestres, que florecen con alrededor de 65-70 hojas totales y alrededor de 60-65 días. Por otra parte, las más tempranas en florecer son las plantas *tem1 tem2* (20-30 hojas totales y 30-40 días), seguidas de *tem2* (40-55 hojas totales y alrededor de los 50 días), tempranas tanto en número

de hojas como en número de días. Seguidamente florecen las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9*, tempranas en hojas (55-60 hojas totales), pero tardías en días (74-78 días) debido a que éstas tienen afectada la velocidad de producción de hojas. Es decir, acaban produciendo menos hojas, pero las producen más lentamente, con lo que se retrasa el momento del *bolting*. Estas plantas (*35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9*) tienen unos valores de número de hojas totales muy similares a la de los mutantes sencillos *tem1* y *rav1*. El análisis estadístico nos indica que no hay diferencia entre estos genotipos, florecen prácticamente con el mismo número de hojas, aunque sí hay diferencia en el número de días debido a la afectación en la velocidad de producción de hojas.

La falta de *TEM1* produce el mismo fenotipo que las plantas deficientes en miR156 y aquellas que muestran altos niveles de *SPL9*. Es decir, podría indicar que no tener *TEM1* produce el mismo efecto que sobre-expresar *SPL9* en el control de la floración.

Las plantas *35S::TEM1* presentan un desarrollo mucho más lento y una evidente afectación en el tamaño de las hojas, al contrario de lo que ocurre en las plantas *tem1 tem2* que parecen mostrar unos limbos foliares más expandidos y un crecimiento algo mayor que el de las plantas silvestres que han crecido 32 días en SD (Fig. 20). Además, si nos fijamos en el estado de desarrollo de las plantas *35S::MIM156*, *pSPL9::rSPL9* y *tem1-1*, que comparten el mismo fenotipo de tiempo de floración, podemos ver que el estado de desarrollo es diferente, debido a que tanto *35S::MIM156* como *pSPL9::rSPL9* producen hojas lentamente. Este rasgo diferencial nos separaría la posible función redundante de *TEM1* y miR156, en la represión de *SPL9*, únicamente como responsable del control del tiempo de floración y no de otros rasgos propios de estas plantas, como la velocidad de producción de hojas.



**Figura 20. Fenotipo de los genotipos estudiados cultivados en condiciones de SD**

Se ha introducido el triple mutante *tem1-1 tem2-2 rav1-1* pero debido a que aún estamos en un estado preliminar de su caracterización no vamos a entrar a detallar los resultados obtenidos hasta el momento con estas plantas. Se muestran plantas con la misma edad cronológica, después de 32 días de cultivo en condiciones de SD.

El análisis del tiempo de floración en condiciones de LD (Tabla 6) se ha restringido al análisis de las plantas mutantes *tem1*, *tem2* y *tem1 tem2*. Todos ellos son significativamente más tempranos en hojas y en días que las plantas silvestres, de acuerdo con los datos publicados previamente (Castillejo & Pelaz, 2008; Osnato et al., 2012).

Genotipo	Fenotipo	Tiempo de floración		Tiempo de floración	
		Roseta ± SD <sup>a</sup>	Caulinares ± SD	Fenotipo	Días ± SD
<b>Experimento 1</b>					
Col-0	WT	12,1 ± 0,9	2,8 ± 0,4	WT	19,6 ± 0,8
<i>tem1-1</i>	Temprano	10,4 ± 0,8	2,7 ± 0,5	Temprano	18,4 ± 0,6
<i>tem2-2</i>	Temprano	9,2 ± 1,3	3,0 ± 0,6	Temprano	15,1 ± 1,2
<i>tem1-1tem2-2</i>	Temprano	6,9 ± 0,7	2,5 ± 0,5	Temprano	14,2 ± 0,8
<b>Experimento 2</b>					
Col-0	WT	12,3 ± 1,1	2,2 ± 0,4	WT	17,3 ± 0,7
<i>tem1-1</i>	Temprano	10,8 ± 0,8	2,6 ± 0,5	Temprano	15,5 ± 0,5
<i>tem2-2</i>	Temprano	8,3 ± 1,1	3,1 ± 0,5	Temprano	13,9 ± 1,0
<i>tem1-1tem2-2</i>	Temprano	7,0 ± 0,9	2,5 ± 0,5	Temprano	12,8 ± 0,7

**Tabla 6. Análisis del tiempo de floración en condiciones de LD**

Se muestra el número de hojas de roseta (Roseta) y el número de hojas caulinares (Caulinares), además del número de días (Días) que tarda en verse el botón floral a simple vista. Se muestran 2 experimentos independientes. <sup>a</sup> SD: desviación estándar. WT (wild-type) indica el fenotipo de las plantas silvestres. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 10 y 15 por genotipo. La significación estadística de estos datos se ha realizado mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Bonferri; la significación obtenida en cada comparación se muestra en el anexo (Anexo – Tabla 6).

## 5.2 Duración de la fase juvenil: juvenilidad

Las mismas plantas usadas para los análisis de floración han servido para cuantificar la duración de la fase juvenil y la duración de la fase adulta, en condiciones de SD (Tabla 7) y en LD (Tabla 8). Para realizar esta cuantificación se ha usado como marcador del inicio de la fase adulta la aparición de tricomas en la parte abaxial de las hojas. Se consideran hojas juveniles las que no presentan tricomas abaxiales, y hojas adultas todas aquellas hojas de roseta que sí los tienen. De acuerdo con los resultados publicados por otros laboratorios, las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9* no presentan etapa juvenil, ya que se observan tricomas en la parte abaxial de todas las hojas que forman a partir de la primera. En cambio, las plantas *35S::MIR156* presentan una etapa juvenil extendida muy acusada, con tricomas abaxiales visibles cuando prácticamente se han formado  $\frac{3}{4}$  partes de las hojas totales que se producen antes de florecer. En el caso de las plantas *sp19 sp115* y *35S::MIM172* el fenotipo no es tan extremo aunque también presentan una etapa juvenil extendida (Schwarz et al., 2008; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009).

Cuando analizamos nuestros genotipos de interés en condiciones de SD (Tabla 7), observamos que las plantas doble mutantes *tem1 tem2* presentan un acortamiento de la fase juvenil, ya que forman los primeros tricomas un par de hojas antes que las plantas silvestres, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en todos los experimentos realizados. Sin embargo, los mutantes sencillos *tem1*, *tem2* y *rav1* muestran una duración de la fase juvenil muy similar a la de las plantas silvestres, por lo que no tienen afectada la duración de la fase juvenil. Por otra parte, las plantas *35S::TEM1* no llegan a formar tricomas abaxiales, y como veíamos anteriormente, tampoco florecen en condiciones de SD, por lo que podemos considerar que todas las hojas que forman, son juveniles y las plantas no pasan al estado adulto.

Genotipo	Número total hojas jóvenes <sup>a</sup>		Número total hojas adultas <sup>b</sup>	
	Fase juvenil	Promedio ± SD <sup>c</sup>	Fase adulta	Promedio ± SD
<b>Experimento 1</b>				
Col-0	WT	9,3 ± 0,7	WT	46,4 ± 3,2
<i>tem1-1tem2-2</i>	Acortada	7,2 ± 0,7	Acortada	8,2 ± 2,9
<i>rav1-1</i>	WT	10,0 ± 1,0	Acortada	38,1 ± 2,3
<i>35S::TEM1</i>	Extendida	NQ <sup>e</sup>	NQ <sup>e</sup>	NV <sup>f</sup>
<i>35S::MIR156</i>	Extendida	73,8 ± 2,9	Acortada	26,7 ± 6,4
<i>35S::MIM156</i>	Acortada	0 ± 0	WT	46,7 ± 5,4
<i>pSPL9::rSPL9</i>	Acortada	0 ± 0	WT	45,9 ± 2,1
<i>spl9-2spl15-2</i>	Extendida	14,0 ± 0,7	Extendida	52,2 ± 1,8
<b>Experimento 2</b>				
Col-0	WT	11,7 ± 1,2	WT	50,5 ± 2,9
<i>tem1-1</i>	WT	13,6 ± 1,3	Acortada	40,9 ± 5,1
<i>tem1-1tem2-2</i>	Acortada	9,9 ± 1,2	Acortada	15,6 ± 3,9
<i>rav1-1</i>	WT	11,9 ± 0,9	Acortada	42,3 ± 2,8
<i>35S::TEM1</i>	Extendida	NQ <sup>e</sup>	NQ <sup>e</sup>	NV
<i>35S::MIR156</i>	Extendida	72,7 ± 6,9	Acortada	25,6 ± 5,3
<i>35S::MIM156</i>	Acortada	0 ± 0	WT	47,9 ± 6,5
<i>pSPL9::rSPL9</i>	Acortada	0 ± 0	WT	46,1 ± 1,4
<i>spl9-2spl15-2</i>	WT	14,3 ± 0,9	Extendida	60,0 ± 5,1
<i>35S::MIM172</i>	Extendida	15,1 ± 1	Extendida	58,4 ± 3,3
<b>Experimento 3</b>				
Col-0	WT	12,0 ± 0,9	WT	51,7 ± 2,5
<i>tem1-1</i>	WT	12,8 ± 1,2	Acortada	42,78 ± 4,3
<i>tem2-2</i>	WT	11,1 ± 1,5	Acortada	35,8 ± 2,4
<i>tem1-1tem2-2</i>	Acortada	10,8 ± 0,7	Acortada	22,1 ± 5,4
<b>Experimento 4</b>				
Col-0	WT	10,6 ± 1,3	WT	46,4 ± 3,5
<i>tem1-1</i>	WT	10,4 ± 1,1	Acortada	41,3 ± 3,9
<i>tem2-2</i>	WT	10,0 ± 1,5	Acortada	23,2 ± 3,2
<i>tem1-1tem2-2</i>	Acortada	9,5 ± 0,9	Acortada	16,9 ± 2,8

**Tabla 7. Análisis de juvenilidad en condiciones de SD**

<sup>a</sup> Se consideran jóvenes las hojas de roseta que no presentan tricomas abaxiales (exceptuando los cotiledones). <sup>b</sup> Se consideran adultas las hojas de roseta que presentan tricomas abaxiales; la primera hoja en la que son visibles a simple vista los tricomas se ha considerado primera hoja adulta. <sup>c</sup> SD: Desviación estándar <sup>e</sup>NQ: No cuantificable. <sup>f</sup> NV: No visible. La significación estadística de estos datos se ha realizado mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Bonferri; la significación obtenida en cada comparación se muestra en el anexo (Anexo – Tabla 7).



Respecto a la duración de la fase adulta, las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9* muestran una fase adulta prácticamente igual a la de las plantas silvestres. Las plantas *35S::MIR156* muestran una fase adulta más corta que las plantas silvestres, ya que la mayor parte de hojas producidas han sido juveniles. Las únicas plantas que mantienen una extensión de ambas fases, juvenil y adulta, son las *spl9 spl15* y *35S::MIM172*. Por su parte, los mutantes sencillos *tem1*, *tem2*, y *rav1* presentan una etapa adulta acortada, con una diferencia respecto a las plantas silvestres estadísticamente significativa. El caso del doble mutante *tem1 tem2* es más acusado, produciendo entre 30 y 40 hojas adultas menos que las plantas silvestres debido a que florecen de manera temprana.

Resumiendo, estos datos nos indican que en SD los mutantes sencillos *tem1*, *tem2*, *rav1* no presentan cambios en la duración de la fase juvenil, pero sí muestran un acortamiento de la fase adulta; mientras que *tem1 tem2* presenta un acortamiento en ambas fases.

En condiciones de LD (Tabla 8), únicamente se han analizado los mutantes sencillos *tem1* y *tem2*, y el doble mutante *tem1 tem2*, en comparación con las plantas silvestres. En este caso, al igual que en condiciones de SD, las plantas *tem1 tem2* tienen acortadas las dos fases de desarrollo. En cambio los mutantes sencillos sólo presentan un acortamiento de la fase adulta y no de la juvenil, coincidiendo con los datos obtenidos en condiciones de SD.

Genotipo	Número total hojas jóvenes <sup>a</sup>		Número total hojas adultas <sup>b</sup>	
	Fase juvenil	Promedio ± SD <sup>c</sup>	Fase adulta	Promedio ± SD
<b>Experimento 1</b>				
Col-0	WT	5,5 ± 0,5	WT	6,6 ± 0,9
<i>tem1-1</i>	WT	6,6 ± 0,7	Acortada	3,7 ± 0,8
<i>tem2-2</i>	WT	6,2 ± 0,8	Acortada	2,9 ± 1,0
<i>tem1-1tem2-2</i>	Acortada	4,8 ± 0,6	Acortada	2,1 ± 0,5
<b>Experimento 2</b>				
Col-0	WT	5,6 ± 0,7	WT	6,7 ± 0,8
<i>tem1-1</i>	WT	6,6 ± 0,8	Acortada	4,1 ± 0,5
<i>tem2-2</i>	WT	5,7 ± 1,1	Acortada	2,7 ± 0,6
<i>tem1-1tem2-2</i>	Acortada	4,8 ± 0,8	Acortada	2,1 ± 0,4

**Tabla 8. Análisis de juvenilidad en condiciones de LD**

<sup>a</sup>Se consideran hojas jóvenes todas las hojas de roseta que no presentan tricomas abaxiales (exceptuando los cotiledones). <sup>b</sup> Se consideran hojas adultas todas las hojas de roseta que presentan tricomas abaxiales; la primera hoja en la que son visibles a simple vista los tricomas se ha considerado como la primera hoja adulta. <sup>c</sup>SD: Desviación estándar. La significación estadística de estos datos se ha realizado mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el test de comparaciones múltiples de Bonferri; la significación obtenida en cada comparación se muestra en el anexo (Anexo – Tabla 8).

En paralelo a estos experimentos hemos analizado si además de formar los tricomas antes en relación al número de hojas, éstos también se forman antes en el tiempo, en relación al número de días.

La tabla 9 muestra el momento de aparición de la primera hoja adulta, según el número de días transcurridos hasta que se observa la aparición de los primeros tricomas abaxiales.

Analizando en detalle cuándo se produce esta primera hoja adulta, observamos que en las plantas *tem1 tem2* se forma antes no sólo en cuanto al número de hojas, sino también en cuanto al número de días.

<b>Genotipo</b>	<b>1ª hoja adulta (rango hojas)</b>	<b>1ª hoja adulta (rango días)</b>	<b>Duración fase juvenil</b>	<b>Botón floral (rango días)</b>
<b>Experimento 1</b>				
Col-0	10-12	24-28	WT	60-64
<i>tem1-1tem2-2</i>	7-9	16-20	Acortada	24-36
<i>rav1-1</i>	10-13	24-28	WT	56-60
<i>35S::TEM1</i>	NV <sup>a</sup>	NQ <sup>b</sup>	Extendida	NQ
<b>Experimento 2</b>				
Col-0	11-14	28-32	WT	65-70
<i>tem1-1tem2-2</i>	9-12	20-24	Acortada	32-40
<i>rav1-1</i>	11-14	28-32	WT	60-68
<i>35S::TEM1</i>	NV	NQ	Extendida	NQ

**Tabla 9. Análisis de la producción de la 1ª hoja adulta en condiciones de SD**

Este cálculo se ha realizado a partir de la detección de la aparición de los primeros tricomas en la cara abaxial del limbo foliar. <sup>a</sup>NV = No visible después de 3 meses, <sup>b</sup>NQ = No cuantificable. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 10 y 15 plantas.

En conjunto todos estos experimentos indican que el doble mutante *tem1 tem2* tiene acortada la fase juvenil en condiciones de LD y SD, pero no los mutantes sencillos, por lo que son redundantes en el control de la duración de la fase juvenil. En cambio, todos ellos, tanto los mutantes sencillos como el doble mutante tienen acortada la duración de la fase adulta.

### 5.3 Velocidad de producción hojas

El número de hojas producidas por unidad de tiempo (hojas/días) define el ratio de producción de hojas (RLP, por sus siglas en inglés), el cuál es inverso al plastocrono, que mide el tiempo entre el inicio de dos hojas consecutivas (días/hojas) (revisado en Lamoreaux et al., 1978).

El fenotipo observado en las plantas *tem* mutantes y *TEM* sobre-expresantes cultivadas en condiciones de SD, sugería que éstas podían tener el ratio de producción de hojas afectado, igual que otros genotipos de la ruta de miRNAs. Un primer análisis de un pequeño número de plantas cultivadas en condiciones de SD durante 24 días sugería que las plantas mutantes producían hojas ligeramente más rápido que las plantas silvestres, mientras que las sobre-expresantes por el contrario, las producían muy lentamente; además de tener afectados otros fenotipos relacionados con el desarrollo (Fig. 21).



**Figura 21. Fenotipo de plantas Col-0, *tem1 tem2* y *35S::TEM1* a día 24 en condiciones de SD**

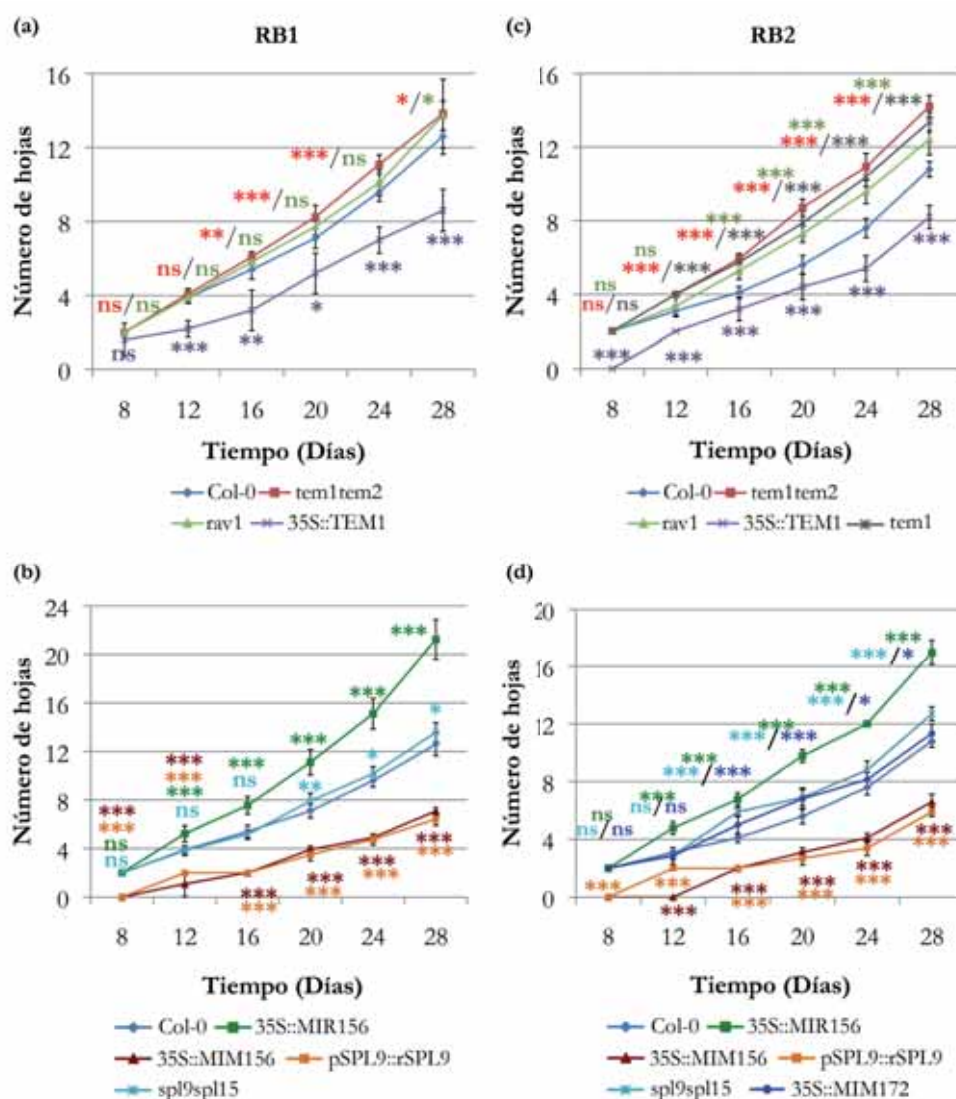
Los números indican las hojas producidas durante un periodo de 24 días en condiciones de cultivo en tierra en SD. El hilo rojo marca la primera hoja producida.

Para estudiar en más detalle si los mutantes *tem* y sobre-expresantes *TEM* tienen alterada la producción de hojas, analizamos a lo largo del desarrollo la aparición de nuevas hojas. Realizamos un seguimiento, desde el día 8 y a lo largo de varias semanas, de una serie de genotipos de la ruta de miRNAs afectados en el ratio de producción de hojas (Fig. 22). Se muestra únicamente el resultado de los días 8 a 28 para remarcar qué ocurre durante las primeras etapas del desarrollo; posteriormente se observa una reducción de la velocidad de producción de hojas a medida que nos acercamos al momento de la floración (datos no mostrados). La representación gráfica muestra el número de hojas producido en un momento del desarrollo determinado (núm. hojas/días). La pendiente de esta gráfica nos indica la velocidad con la que se producen nuevas hojas; cuanto mayor es la pendiente, más rápido se producen.

Los resultados obtenidos confirman que las plantas *35S::MIR156* producen hojas muy rápidamente, es decir tienen un plastocrono corto al invertir poco tiempo en producir una nueva hoja. Por el contrario, las plantas *35S::MIM156* tardan más tiempo en producir nuevas hojas, igual que las plantas *pSPL9::rSPL9*. Las plantas *sp19 sp15* presentan un fenotipo más moderado en la velocidad en que producen hojas nuevas, siendo ligeramente más rápido que en las plantas silvestres (Schwarz et al., 2008; Wang et al., 2008; Wu et al., 2009). Por su parte, *35::MIM172* no parece tener este rasgo afectado y produce hojas prácticamente al mismo ritmo que las plantas silvestres.

Si comparamos estos ratios con los obtenidos en las plantas *tem1 tem2* observamos que *tem1 tem2* producen hojas significativamente más rápido que las plantas silvestres. Los mutantes sencillos analizados *tem1* y *rav1* parecen también ligeramente más rápidos produciendo hojas, aunque en el caso de *rav1* una de las muestras analizadas (RB2) presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a las plantas Col-0, pero no la otra; por lo que tenemos que confirmar estos resultados con una nueva réplica, igual que ocurre en con el mutante sencillo *tem1* del cual sólo tenemos datos de una muestra biológica. Sin embargo,

hay que destacar que en ambas muestras (RB1 y RB2), la velocidad de producción de hojas de los mutantes sencillos *rav1* es muy similar a las de las plantas *sp19 sp15*. Por el contrario, las plantas *35S::TEM1* son significativamente más lentas que las plantas silvestres produciendo hojas nuevas, con valores similares a los de las plantas *35S::MIM156* o *pSPL9::rSPL9*, aunque sin llegar a un ratio tan bajo. Además, estas plantas presentan una elevada tasa de mortalidad, por lo que el análisis de la primera muestra biológica (RB1) incluye un número muy bajo de plantas analizadas (5 plantas), lo que no impide que la diferencia sea significativa.



**Figura 22. Análisis de la velocidad de producción de hojas en condiciones de SD**

El ratio de producción de hojas de roseta, cuantificado como el número de hojas producidas en un tiempo determinado, indica la velocidad con la que se producen las hojas. Se han analizado dos muestras biológicas, RB1 (a-b) y RB2 (c-d). En la RB1 se han analizado entre 5 y 12 plantas por genotipo; en la RB2 se han analizado entre 8 y 21 plantas. Las barras de error muestran la desviación estándar de las muestras biológicas analizadas por cada punto. Los asteriscos muestran la significación estadística ( $p > 0,05$ ) de cada genotipo respecto al valor de las plantas silvestres (Col-0). Test *t*-Student) \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , NS, No significativo ( $p > 0,05$ ).

En resumen, las plantas *tem1 tem2* y *35S::TEM1* tienen claramente afectada la producción de hojas. *tem1 tem2* con una producción acelerada respecto a las plantas silvestres, en un rango intermedio entre las plantas *35S::MIR156* y las *spl9 spl15*; mientras que *35S::TEM1* son considerablemente más lentas, y similares a las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9*. Esta comparación nos indica que la regulación de la velocidad de producción de hojas es contraria a la que hemos descrito para la regulación del tiempo de floración, ya que *35S::TEM1* se comportaría igual que *35S::MIM156* y *pSPL9::SPL9*, de manera distinta a lo que ocurre en el control del tiempo de floración.

## 6. Confirmación genética de la relación entre la ruta de miRNAs y TEM

Para acabar de establecer el modo de regulación de los diferentes componentes de la ruta de miRNAs, se han realizado una serie de cruces que nos permitirán esclarecer la relación entre sus distintos componentes. Actualmente, estamos trabajando en la selección de las plantas homocigóticas de los cruces que se muestran en la tabla 10. Se detalla en ella el estadio de selección en que se encuentran. Todas estas combinaciones genéticas serán útiles para determinar si los efectos de TEM1 y TEM2 en la expresión de *miR156*, *SPL9* y *miR172* son importantes para la regulación del tiempo de floración y el mantenimiento de la fase juvenil o de la velocidad de producción de hojas.

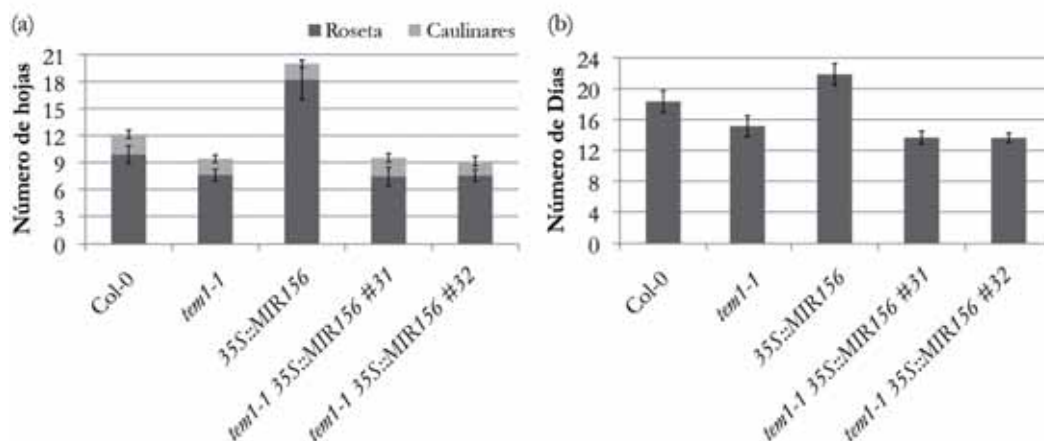
Genotipos		Generación			Selección
Hembra	Macho	F1	F2	F3	
pTEM1::GUS	<i>35S::MIR156</i>	✓	✓	✓	Basta (ppt)
<i>tem1-1</i>	<i>35S::MIR156</i>	✓	✓	✓	Basta (ppt)
<i>tem1-1tem2-2</i>	<i>35S::MIR156</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt)
<i>tem1-1tem2-2</i>	<i>35S::MIM156</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt)
<i>tem1-1tem2-2</i>	<i>pSPL9::rSPL9</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt)
<i>tem1-1tem2-2</i>	<i>spl9-2spl15-2</i>	✓	En proceso	-	Genotipado líneas SALK
<i>tem1-1tem2-2</i>	<i>35S::MIM172</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt)
<i>35S::TEM1</i>	<i>35S::MIR156</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt) + GFP semilla
<i>35S::TEM1</i>	<i>35S::MIM156</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt) + GFP semilla
<i>35S::TEM1</i>	<i>pSPL9::rSPL9</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt) + GFP semilla
<i>35S::TEM1</i>	<i>spl9-2spl15-2</i>	✓	En proceso	-	GFP semilla + genotipado
<i>35S::TEM1</i>	<i>35S::MIM172</i>	✓	En proceso	-	Basta (ppt) + GFP semilla

**Tabla 10. Resumen de cruzamientos realizados para establecer las interacciones génicas**

Se incluyen en esta tabla los genotipos parentales y el estado actual de la generación de las distintas líneas filiales. Además del método de selección para obtener las diferentes líneas homocigotas.

Actualmente ya disponemos de plantas homocigotas del cruce realizado entre *tem1* y *35S::MIR156*. Como ya sabemos, las plantas *35S::MIR156* florecen tardíamente, en condiciones de LD y SD, sin embargo cuando las cruzamos con el mutante sencillo *tem1*, que es temprano en ambas condiciones de fotoperiodo, obtenemos una reducción en el tiempo de floración que coincide con el tiempo de floración que muestra el mutante *tem1* en las

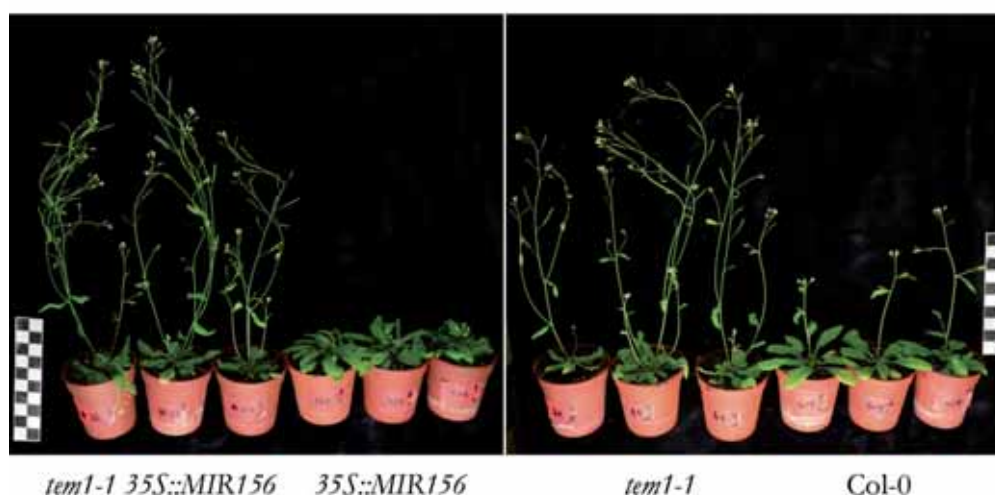
condiciones analizadas de LD (Fig. 23). Es decir, la falta de TEM1 provoca un adelanto de la floración en las plantas sobre-expresantes de miR156, reduciendo el número de hojas producidas y el número de días que estas plantas tardan en florecer.



**Figura 23. Tiempo de floración del cruzamiento *tem1 35S::MIR156* y los respectivos parentales en condiciones de LD**

Se muestra (a) el número de hojas de roseta y el número de hojas caulinares, y (b) el número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista. Se muestra el resultado de la descendencia de dos plantas homocigotas (#31 y #32). Se han analizado 14-15 plantas por genotipo. Las barras de error indican la desviación estándar de las muestras biológicas analizadas.

El fenotipo de floración temprana observado (Fig. 24) nos indica que TEM1 debe ser necesario para la regulación del tiempo de floración vía miR156. Queda por establecer si también estas plantas tienen ligeramente adelantado el cambio de fase juvenil-a-adulto, a partir de la cuantificación de la producción de tricomas abaxiales, aún por determinar.



**Figura 24. Fenotipo de las plantas *tem1 35S::MIR156* y los respectivos parentales en condiciones de LD**

Las plantas se cultivaron en tierra. Se muestran 3 plantas representativas de cada línea.

## DISCUSIÓN

La cascada de regulación temporal de miR156, *SPL9* y miR172 permite el mantenimiento de una fase juvenil suficientemente larga, debido a los altos niveles de miR156 al principio del desarrollo, y la transición a la fase adulta e inicio de la floración por acumulación progresiva de *SPL9* y miR172, que inducen a promotores de la floración e inhiben a represores, respectivamente (revisado en Fornara & Coupland, 2009; Huijser & Schmid, 2011; Zhu & Helliwell, 2011). Por otro lado, los genes *TEMPRANILLO* se expresan en etapas tempranas del desarrollo y su disminución, también progresiva, permite la activación de los inductores de la floración, el gen *FT* (Castillejo & Pelaz, 2008) y los genes de biogénesis de las GAs *GA3ox1/2* (Osnato et al., 2012). La similitud en el patrón de expresión temporal de miR156 y *TEM1/TEM2* y los fenotipos causados por su sobre-expresión y pérdida de función (Fig. 8) sugerían la posibilidad de que los genes *TEM* estuvieran en la misma ruta que miR156. El conjunto de datos obtenidos en los experimentos realizados en esta tesis indica que existe una relación entre *TEM* y los distintos componentes que actúan en esta ruta de regulación de la floración y la juvenilidad, controlada por miR156, *SPL9* y miR172.

### 1. TEM1 regula positivamente a miR156 y éste requiere a TEM1 para regular el tiempo de floración

Los análisis de predicción *in silico* realizados apuntaban a que los genes *TEM/RAV* podrían regular la expresión de miR156, *SPL9* y miR172, al detectarse varios sitios de unión para las proteínas RAV en las secuencias promotoras y codificantes de *MIR156A*, *SPL9* (y otros *SPL* relacionados con floración), *MIR172A-C* y *MIR172E* (Tabla 4). Por otra parte, el análisis de las secuencias de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* nos indicaba que ninguno de estos genes parecía estar directamente regulado por la acción de miRNAs, incluidos miR156 y miR172.

Los resultados obtenidos en los análisis de expresión realizados coincidían con esta posible falta de regulación mediada por los citados miRNAs. Cambios en miR156 no afectan a los niveles de mRNA de *TEM1* ni de *TEM2* a lo largo del desarrollo en SD, ya que no hemos obtenido una diferencia destacable en los valores de *TEM1* o *TEM2* entre las plantas silvestres y las plantas sobre-expresantes o *mimicry* de miR156 (Fig. 11), así como tampoco hemos observado diferencias significativas en el ensayo histoquímico de GUS entre las plantas *pTEM1::GUS* y las *35S::MIR156 pTEM1::GUS* (Fig. 12). Sin embargo, el cruce realizado entre las plantas *tem1* y *35S::MIR156* indica que miR156 requiere a *TEM1* para el control de la floración mediada por la edad, ya que las plantas *tem1 35S::MIR156* presentan el mismo fenotipo de floración temprana que los mutantes sencillos *tem1* en LD (Fig. 23 y 24). Este inesperado resultado sugiere que miR156 podría regular los niveles o la actividad de la proteína *TEM1*, aunque no por corte directo de su mRNA.

Además, el análisis de la acumulación de miR156 en las plantas *35S::TEM1* y *tem1 tem2* en LD (Fig. 13) nos indica que TEM parece regular positivamente a miR156, al obtenerse un notable incremento en las plantas *35S::TEM1* y un descenso muy ligero en las plantas *tem1 tem2*. En estas últimas, el cambio observado es de una magnitud similar al efecto de miR156 en miR172 (Fig. 18; Wu et al., 2009), lo que sugiere que este pequeño cambio podría ser relevante. Actualmente estamos trabajando en la comprobación experimental de una posible unión de TEM1 a *MIR156A*, cuyo promotor tiene un posible sitio de unión bastante conservado para proteínas de la familia RAV (CACCA-N4-ATCCTG) (Tabla 4). Sin embargo, por lo que sabemos hasta ahora, las proteínas RAV actúan como reguladores negativos de la expresión génica (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009; Kagaya et al., 1999), por lo que parece más probable que TEM1 y TEM2 actúen reprimiendo a algún represor de miR156, es decir, de forma indirecta. Alternativamente, TEM1 y TEM2 podrían regular a algún factor implicado en la biogénesis de los miRNAs o en las rutas de silenciamiento de RNA.

De confirmarse la regulación proteica de TEM1 por miR156 y la regulación directa o indirecta de miR156 por TEM1, podríamos hablar de un bucle de retroalimentación positivo, directo o indirecto, entre estos dos represores de la floración, lo que aseguraría un estricto control de la ésta. Por otro lado, la regulación de los diferentes componentes implicados en la ruta miR156-SPL-miR172-AP2 incluye varios bucles de retroalimentación positiva y negativa (Mathieu et al., 2009; Schwab et al., 2005; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Yant et al., 2010), por lo que es posible que los genes *TEM* también estén implicados en este tipo de regulación. Esta posibilidad la sugieren dos hechos: que los genes *TEM* también afectan a la expresión de otros componentes por debajo de miR156, como SPL9 y miR172, que a su vez afectan a miR156, y que el efecto de los genes *TEM* en miR156 (Fig. 13) es mucho menor que en *SPL9* (Fig. 15) o miR172 (Fig. 18). Por tanto, no podemos descartar que el efecto en la expresión de miR156 sea indirecto a través de la regulación de alguno de estos componentes.

Hasta ahora se conocían pocos detalles de la regulación de miR156. Muy recientemente se ha postulado la función de la trehalosa como reguladora de este miRNA (Wahl et al., 2013), aunque queda por determinar qué componente determina su caída a lo largo del desarrollo. Esta tesis propone que los genes *TEM* podrían estar implicados en esta regulación temporal, al regular positivamente los niveles de miR156, directa o indirectamente. La disminución progresiva de TEM a lo largo del desarrollo conllevaría una inducción progresivamente más débil de miR156.



## 2. TEM reprime directamente, y probablemente también de forma indirecta, la expresión de SPL9

SPL9, junto con SPL15, promueve los rasgos morfológicos de las hojas adultas (Telfer et al., 1997; Usami et al., 2009); además, reduce la velocidad de producción de hojas y acelera la floración a través de la activación de la transcripción de *MIR172B* (Wu et al., 2009) e, independientemente, a través de la activación de *SOC1*, *AP1*, *FUL* y *AGL42* (Wang et al., 2009).

Hemos demostrado que TEM reprime la expresión de *SPL9* en LD (Fig. 15), a través de la unión directa a su DNA (Fig. 16), en fases tempranas del desarrollo en LD, lo que coincide con la acción represora de miR156 sobre *SPL9*. Esto sugiere que miR156 y TEM tienen el mismo efecto sobre *SPL9* en el control de la floración y que podrían actuar en parte en paralelo, además de regularse mutuamente de manera positiva. Además, ya que TEM regula la acumulación de miR156 (Fig. 13), y éste reprime a *SPL9*, TEM estaría también actuando de manera indirecta sobre la regulación de *SPL9*, a través de miR156.

Probablemente la caída en los niveles de *TEM* sea necesaria para la activación de *SPL9*, igual que lo es la reducción de miR156 con la edad. Un experimento que podría confirmar si TEM regula temporalmente a *SPL9* sería un seguimiento de la expresión de *SPL9* a lo largo del desarrollo en plantas silvestres, plantas *35S::TEM*, de forma que podríamos determinar si se produce o no su activación, y plantas *tem1 tem2* para demostrar si la ausencia de TEM permite una acumulación más temprana.

La expresión de *SPL9* en las plantas silvestres se centra en las hojas, en el ápice del tallo, en los primordios foliares y en las flores jóvenes (Schmid et al., 2005). Se ha detectado su expresión en plántulas enteras y primordios foliares a partir de las 3 semanas y un incremento con la edad de la planta, en experimentos de expresión *in situ* y RT-qPCR (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009) y mediante ensayos de GUS en plantas *pSPL9::GUS* en SD (Yang et al., 2011). Por tanto, también sería posible que TEM regulase los niveles de mRNA de *SPL9* en SD. Además, TEM actúa también en el SAM (Osnato et al., 2012) por lo que no descartamos que pudiera reprimir a éste y otros SPL en varios tejidos.

Por otra parte, aunque las plantas *pSPL9::rSPL9* muestran un ligero incremento en el nivel de mRNA de *TEM1* (Fig. 14), las plantas *sp9 sp15* no tienen alterada la expresión de este gen, por lo que no podemos concluir que SPL9 regule la expresión de *TEM1*. El efecto observado en las plantas sobre-expresantes podría ser un artefacto de la propia sobre-expresión y no una regulación real; sin embargo, tampoco podemos descartar que la falta de cambio en las plantas *sp9 sp15* pueda ser debida al momento del desarrollo escogido para realizar el experimento. En las plantas silvestres, SPL9 no se expresa en periodos tempranos del desarrollo, por tanto su falta de expresión en ese momento (en plantas *sp9 sp15*) no comportaría un efecto en la regulación de sus dianas, como se puede observar en la expresión de *SOC1* (Fig. 14).

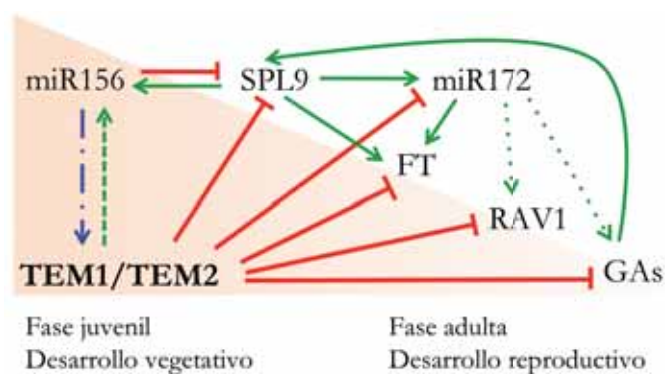
El análisis *in silico* de los promotores de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* sugería la posibilidad de que algún SPL regulase la expresión de estos genes, al haber múltiples sitios de unión SBP en sus promotores (Fig. 10), especialmente en el promotor de *TEM1*. Como hemos comentado en la introducción, la familia de factores de transcripción SPL es bastante amplia y muestra una elevada redundancia funcional (Cardon et al., 1999; Rhoades et al., 2002). Además los sitios de unión no determinan necesariamente una afinidad específica por un factor u otro, por lo que no podemos saber cuál/es podría/n unirse al DNA de los genes *TEM/RAV*, ni en qué momento del desarrollo o tejido podrían hacerlo. Nuestros resultados no descartan, por tanto, que otros SPLs puedan regular a *TEM1* o a *TEM2*.

### **3. TEM reprime directamente, y probablemente también de forma indirecta, la expresión de MIR172C**

La expresión de miR172 es más alta en LD que en SD, donde silencia a los represores florales *AP2-like*, que reprimen directamente al inductor floral *FT* de forma independiente de CO, en una ruta alternativa a la inducción de la floración por el fotoperiodo (Jung et al., 2007). No hemos observado ninguna regulación de los niveles de mRNA de *TEM* por parte de miR172, lo que no descarta que pueda haber una regulación post-transcripcional (Fig. 17). Sin embargo, sí hemos comprobado que *TEM1* y *TEM2* reprimen a *MIR172*, tal y como demuestran los resultados obtenidos por RT-qPCR y *Northern blot* en plantas *35S::TEM1* y *tem1 tem2* (Fig. 18), y que *TEM1* lo hace directamente (Fig. 19) al unirse a los sitios RAV presentes en la secuencia de *MIR172C*. Actualmente estamos trabajando en la comprobación experimental de la posible unión directa a otros genes *MIR172* que también presentan sitios de unión RAV (Tabla 4). Además, como en el caso de *SPL9*, *MIR172* también está controlado de manera indirecta por TEM; al regular a *SPL9*, el efecto de los TEM en miR172 también puede estar mediado en parte por *SPL9*.

De manera indirecta, la represión que ejerce *TEM1* sobre *MIR172C* afectaría a la expresión de los represores florales de la familia AP2 que están regulados por este miRNA, es decir, se des-reprimirían estos reguladores negativos de la floración que, junto a los *TEM*, bloquearían la activación no sólo de *FT*, sino también de *SOC1*, *AP1* y *FUL*. Además, parece probable que existan bucles de retroalimentación entre los genes *TEM* y los genes *AP2-like*, ya que se ha observado la unión de SMZ y AP2 a *TEM1* en inflorescencias y hojas, respectivamente (Yant et al., 2010), así como un incremento de expresión de *TEM2* en plantas *smz-D* (dominante negativo de SMZ) (Mathieu et al., 2009).

En resumen, nuestros resultados sugieren que los genes *TEM* juegan un papel en la regulación de la floración a través de la ruta de la edad, mediante el control del proceso en distintos puntos de la ruta genética, controlando directa e indirectamente a *SPL9* y miR172c, y estableciendo un bucle de regulación positiva con miR156.



**Figura 25. Esquema de la regulación de los distintos componentes de la ruta de la edad por TEM1 y TEM2**

Los genes TEM actúan sobre miR156, *SPL9* y miR172. En el caso de miR156, activan la expresión de manera directa o indirecta (flecha discontinua verde), con una posible regulación adicional de TEM1 (quizás de la proteína) por miR156, (flecha discontinua azul). TEM1 y TEM2 reprimen de manera directa y probablemente también indirecta a *SPL9* (línea roja). Además, reprimen de manera directa y probablemente también indirecta a miR172 (línea roja). Esta regulación de la expresión es coherente con los efectos de todos estos genes en la floración y en la duración de la etapa juvenil.

#### **4. TEM1 y TEM2 regulan el tiempo de floración a través de la ruta de miR156, SPL9 y miR172**

El doble mutante *tem1 tem2* florece claramente más temprano que cualquiera del resto de los genotipos analizados en SD (Tabla 5). Al ser un represor directo de la síntesis de GAs activas, mediante la represión de *GA3ox1/2*, su ausencia provoca una clara aceleración de la floración y las plantas *tem1 tem2* florecen con menos hojas y tardan menos tiempo en florecer que las plantas silvestres y el resto de genotipos estudiados. El fenotipo de floración temprana de *tem1 tem2* se correlaciona también con los cambios en la expresión de miR156, *SPL9* y miR172 que ocurren en estas plantas. En concreto, el represor miR156 tiene disminuida su expresión en las plantas *tem1 tem2* (Fig. 13), mientras que los activadores *SPL9* y miR172 tienen aumentada considerablemente su expresión (Fig. 15 y 18). De esta manera es esperable que la reducción de miR156 y el incremento de *SPL9* y miR172 observado en las plantas *tem1 tem2* provoquen un adelanto de la floración, considerablemente más pronunciado que en las plantas de floración temprana *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9* analizadas, probablemente debido a la acción directa de los genes TEM sobre los genes *GA3ox1/2* en condiciones de SD (Osnato et al., 2012). Además, hemos observado el efecto opuesto en las plantas *35S::TEM1*. Es decir, nuestros resultados sugieren que en el fenotipo tardío de las plantas *35S::TEM1* está implicado el incremento de la expresión de miR156 y la reducción de *SPL9* y miR172, de acuerdo con el fenotipo de floración de las plantas *35S::MIR156*, *spl9 spl15* y *35S::MIM172*, todas ellas tardías (Franco-Zorrilla et al., 2007; Schwab et al., 2005; Schwarz et al., 2008).

A la regulación directa de *SPL9* y *MIR172C* podría sumarse un posible efecto de regulación indirecta causado por los múltiples bucles de retroalimentación que regulan a

miR156, SPL9 y miR172 (Wu et al, 2009). El bucle de retroalimentación positivo entre miR156 y TEM1 generaría una reducción de los niveles de *SPL9* y miR172, mientras que la acción directa de *TEM1* sobre *SPL9* comporta una reducción de miR172.

Es destacable también que las plantas *tem1*, *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9* florecen con un número de hojas muy similar (Tabla 5). Es decir, las plantas que no tienen *tem1* florecen en el mismo estadio de desarrollo que las plantas que tienen reducidos los niveles de miR156 (*35S::MIM156*), las cuales, a su vez, muestran un incremento de SPL (Franco-Zorrilla, 2007) y florecen de forma parecida a las plantas *pSPL9::rSPL9* (Tabla 5). Esto es congruente con los datos de expresión obtenidos. Además, el resultado del análisis del tiempo de floración de las plantas *tem1 35S::MIR156*, realizado en condiciones de LD (Fig. 23), sugiere que TEM1 sería necesario para el fenotipo de floración tardía de las plantas *35S::MIR156*. Es decir, miR156 necesita a TEM1 para controlar el tiempo de floración y el déficit de TEM1 provoca que miR156 no sea funcional. Esto apoya la conclusión de que al menos TEM1 actúa en la ruta de regulación de la floración por la edad.

Por tanto, TEM1 y TEM2 no estarían actuando únicamente sobre *FT* y *GA3ox1/2*, sino que también estarían controlando, directa e indirectamente, la ruta de control de la floración mediada por miR156, SPL9 y miR172, que regula no sólo a *FT*, sino también a toda una serie de activadores, como otros *SPL*, *SOC1*, *FUL*, *LFY*, *AP1*, GAs, etc. (Galvão et al., 2012; Wang et al., 2009; Wu & Poethig, 2006; Yamaguchi et al., 2009; Yu et al., 2012). Por tanto, el tiempo de floración de las plantas *tem1 tem2* es consecuencia de la afectación de toda una serie de reguladores de la floración, aparte de *FT* y de la acumulación de GAs. Este sistema complejo de regulación en red, y no únicamente en cascada, confiere una robustez al sistema de control del tiempo de floración; asegurando de este modo que ésta no se produce demasiado pronto, cuando la planta aún es joven y tiene pocas reservas acumuladas. De este modo se crean una serie de rutas de regulación interconectadas, en las cuales TEM estaría actuando de forma directa sobre *FT* y las GAs y de manera indirecta a través de la ruta de la edad de miR156-SPL9-miR172. A su vez, las GAs regulan positivamente a SPL9 (Yu et al., 2012), con lo que la represión de éstas por *TEM* también reforzaría la regulación negativa que éstos ejercen directamente sobre SPL9 (Fig. 25).

Finalmente, la reciente publicación del interactoma de las proteínas TOPLESS (TPL) y TPL-*related* (TPR) ha permitido identificar a una serie de proteínas que interactúan con ellas, entre las cuales se encuentran algunas implicadas en la represión de *FT*, entre ellas TEM1, AP2, TOE1 y AGL15. Además se ha observado la interacción de la familia de TPL/TPR con miembros de la familia AP2, entre ellos AP2, TEM1, TOE1 y TOE2 (Causier, et al., 2012). Estos datos sugieren que TEM1 podría formar parte de un complejo en el que también estarían TOE y AP2.

## 5. TEM1 y TEM2 controlan la duración de la fase juvenil y de la fase adulta

miR156 es necesario para asegurar el mantenimiento de la fase juvenil a través de la represión de *SPL9* y otros *SPL* (Rhoades et al., 2002; Schwarz et al., 2008; Wang et al., 2009; Wu & Poethig, 2006). Las plantas deficientes en miR156 (*35S::MIM156*) no presentan fase juvenil, ni tampoco las plantas *pSPL9::rSPL9*. El nivel de expresión de los factores *SPL* se relaciona con el inicio de la formación de tricomas abaxiales en las hojas, uno de los rasgos fenotípicos más evidentes del paso a la fase adulta (Wu & Poethig, 2006; Wu et al., 2009). De acuerdo con los resultados de expresión de *SPL9* en las plantas *tem1 tem2* (Fig. 15), TEM1 y TEM2 reprimen a *SPL9*, aunque el efecto no sería tan significativo como el que ejerce miR156 sobre *SPL9* al inicio del desarrollo, ya que en las plantas *tem1 tem2* observamos una fase juvenil significativamente más corta que en las plantas silvestres, pero no anulada como en las plantas *35S::MIM156* (Tabla 7), en las que la expresión de *SPL9* es elevada. Esto podría deberse a la redundancia funcional de los factores *SPL*, ya que la aparición de tricomas abaxiales también está controlada por otros *SPL*, como *SPL3/SPL4/SPL5*, que son silenciados por miR156 (Cardon et al., 1999; Schwarz et al., 2008; Wang et al., 2008; Wu & Poethig, 2006; Yu et al., 2010). Por el momento no sabemos si TEM1 y TEM2 también reprimen a otros *SPL*, pero sí que son redundantes en la represión de *SPL9* y que es necesaria la falta de ambos para que la fase juvenil se vea reducida, ya que en los mutantes sencillos *tem1* y *tem2* no se han observado diferencias en la duración de esta fase respecto al tipo silvestre Col-0.

Por otra parte, las plantas que sobre-expresan *TEM1* o *TEM2* no presentan tricomas abaxiales en LD ni SD, y parecen florecer sin estos tricomas al menos en LD (Tabla 9). Estos resultados nos indican que su fase juvenil está largamente extendida, de manera más acusada que en las plantas *35S::MIR156*, las cuales sí acaban formando tricomas abaxiales antes de florecer (Wu et al., 2009). Podríamos considerar que la sobre-expresión de *TEM1* mantiene a la planta en un estado de permanente juvenilidad que, sin embargo, le permite florecer en LD sin pasar a la etapa vegetativa adulta.

Aparte de los factores *SPL*, el control de la aparición de tricomas en la parte abaxial de las hojas está también regulado por las hormonas giberelinas (Chien & Sussex, 1996; Poethig, 2003). En los mutantes deficientes en GA se observa un retraso en la aparición de tricomas abaxiales (Telfer et al., 1997). La ausencia de tricomas en las hojas de las plantas *35S::TEM1* coincide con una reducción de la síntesis de GA por represión directa de los genes de su biogénesis, *GA3ox1* y *GA3ox2* (Osnato et al., 2012). Por tanto, parece factible que TEM pueda regular la aparición de rasgos relacionados con la fase adulta a dos niveles: reprimiendo de manera directa a *SPL9* y reprimiendo de manera directa a *GA3ox1/2*, manteniendo así la duración de la fase juvenil, en paralelo a la acción de miR156. Sin embargo, el efecto de los genes *TEM* parece ser menos importante en la etapa juvenil que la acción de miR156 y *SPL9*, ya que en las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9* no existe la

fase juvenil, mientras que las plantas *tem1 tem2* forman entre 7 y 10 hojas juveniles en SD y entre 4 y 5 en LD (Tablas 7, 8). Por otra parte, la duración de la fase adulta también está acortada en todos los mutantes *tem/rav* analizados, tanto en los mutantes sencillos como en el doble *tem1 tem2*. En el caso del doble mutante, el acortamiento de la fase adulta es muy acusado, lo que provoca un adelanto de la floración en SD y LD (Tablas 5,6); en cambio en las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9* la fase adulta no parece acortada y es similar a la silvestre. En conjunto, estos datos sugieren que miR156 y SPL9 tienen un efecto más importante que TEM en el control de la duración de la fase juvenil, mientras que TEM1 y TEM2 afectan marcadamente a la duración de la fase adulta y en menor medida a la fase juvenil.

## 6. RAV1 y su implicación en la ruta de miR156/miR172

Adicionalmente, hemos incluido el estudio de la posible regulación e implicación de RAV1 en el control de la ruta de regulación de la floración por la edad. Si bien no teníamos información previa que nos indicara que *RAV1* podía estar relacionado con esta ruta, consideramos interesante analizar su posible participación en el control de la floración, ya que es el gen más próximo filogenéticamente a *TEM1* y *TEM2*.

La regulación de RAV1 merece una consideración aparte, ya que su expresión en las plantas silvestres a lo largo del desarrollo no se reduce como ocurre con *TEM1* y *TEM2*. Además, al contrario de lo esperado para *TEM1* y *TEM2*, los valores de expresión de *RAV1* obtenidos en las plantas *35S::MIM156* indican una regulación negativa de *RAV1* por miR156, mientras que SPL9 y miR172 parecen regular positivamente su expresión. Estos cambios cuadran con la regulación secuencial de miR156, SPL9 y miR172. Es decir, en las plantas *35S::MIM156*, en las que los niveles de SPL9 y miR172b están incrementados (Wu et al., 2009), la expresión de *RAV1* también está incrementada a lo largo de todo el periodo de desarrollo analizado (Fig. 11). Las plantas *pSPL9::rSPL9* también muestran una regulación positiva de *RAV1* (Fig. 14), y por último, en las plantas *35S::MIM172*, los niveles de *RAV1* son más bajos que en las plantas silvestres (Fig. 17). Todos estos resultados nos indican que miR156 es un regulador negativo de *RAV1*, probablemente a través de SPL9 y miR172, que actuarían como reguladores positivos.

A pesar de poder situar a RAV1 en la ruta de miR156/SPL9/miR172, aún no sabemos qué función realiza en ella. Recientemente se ha descrito la implicación de miR156 y miR172 en los procesos de vernalización en *Cardamine flexuosa* (Zhuo et al., 2013) y *Arabidopsis alpina* (Bergonzi et al., 2013), por lo que podría ser interesante saber si RAV1, también involucrado en respuestas al frío (Fowler et al., 2005; Kagaya et al., 1999) podría estar implicado en esta ruta en respuesta a estas condiciones en *Arabidopsis thaliana*.

En relación al control del tiempo de floración y a la duración de las fases juvenil y adulta, el mutante *rav1* parece florecer con un número de hojas ligeramente inferior al de las plantas

silvestres en SD (Tabla 5); y, al igual que ocurre con los mutantes *tem*, el mutante *rav1* presenta una fase adulta más corta, pero sin diferencias en la duración de la fase juvenil respecto a las plantas silvestres, en SD (Tabla 7). Estos datos sugieren que la función de RAV1 sería similar a la de TEM, aunque los datos de expresión indican lo contrario. Por tanto, son necesarios más experimentos para determinar si estos genes son redundantes o no en estos procesos.

## 7. TEM1 y RAV1 regulan negativamente la velocidad de iniciación de las hojas

Los fenotipos de tiempo de floración y de duración de la fase juvenil observados en las plantas sobre-expresantes y mutantes de los genes *TEM* son coherentes con los fenotipos y cambios de expresión esperados para los distintos genes de la ruta de control de la floración por la edad, *MIR156/SPL9/MIR172*. Además, un estudio fenotípico más detallado de esas mismas plantas indica que hay otros procesos en los que los genes *TEM* podrían estar también relacionados con la regulación de *MIR156/SPL9/MIR172*, como es la velocidad de producción de las hojas.

Se ha descrito que las plantas *35S::MIR156*, al igual que las *sp/9 spl/15*, presentan una velocidad de producción de hojas elevada (plastocrono corto), al contrario de lo que ocurre en las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9*, que producen hojas lentamente (plastocrono largo) (Schwarz et al., 2008; Wang et al., 2008; Wu et al., 2009). Es decir, miR156 acelera la producción de hojas y *SPL9* la desacelera. El seguimiento de la producción de hojas muestra que las plantas *35S::TEM1* se comportan igual que las *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9* en cuanto a la lentitud en la formación de las hojas; por otra parte, el doble mutante *tem1 tem2* es significativamente más rápido formando nuevas hojas que las plantas silvestres, aunque menos que otros genotipos, como *35S::MIR156* (Fig. 22). Es decir, TEM1 es un regulador negativo de la velocidad de producción de hojas, igual que SPL9 y SPL15 (Schwab et al., 2008). Estos fenotipos de las plantas *35S::TEM1* y *tem1 tem2* no concuerdan con su efecto en miR156 y *SPL9*. Sin embargo, este hecho podría explicarse por la relación entre la duración del plastocrono y la velocidad de división celular: un plastocrono corto (producción rápida de hojas) se asocia a una división celular acelerada (Kawakatsu et al., 2006). Las plantas *35S::TEM1* son significativamente más pequeñas que el resto de los genotipos estudiados, mientras que las *tem1 tem2* presentan un limbo foliar más extendido que las plantas silvestres en SD (Fig. 20 y 21). Aunque no hemos cuantificado la velocidad de división celular o el tamaño celular, el fenotipo sugiere que podrían estar afectados. Si así fuera, explicaría el plastocrono corto (producción rápida de hojas) observado en las plantas *tem1 tem2* (Fig. 22).

De esta manera, los mutantes y sobre-expresantes de TEM podrían tener afectada la producción de hojas de forma independiente de la acción de miR156 y SPL9, por acción de otros reguladores que actuaran en la división o tamaño/expansión celular, como las hormonas citoquininas, conocidas reguladoras de la división y diferenciación celular

(revisado en Barton, 2010), o las auxinas (Perrot-Rechenmann, 2010). En este sentido, el fenotipo de las plantas *35S::TEM1* también podría relacionarse con la falta de auxinas y giberelinas en el SAM, ya que presentan una clara pérdida de dominancia apical (Fig. 8) (revisado en Domagalska & Leyser, 2011; Lohmann et al., 2010).

Por su parte, el mutante *rav1* produce hojas ligeramente más deprisa que las plantas silvestres (Fig. 22), lo que concuerda con el fenotipo previamente publicado de las plantas que sobre-expresan RAV1 que producen hojas más lentamente (Hu et al., 2004). Sin embargo, parece que la producción de hojas muestra valores silvestres en las plantas con una reducción parcial en los niveles de RAV1 (*RAV1-U*, *under-regulated*) (Hsu et al., 2004), por lo que sería necesario eliminar por completo su efecto para detectar el fenotipo de velocidad de producción de hojas observado en el mutante nulo *rav1*. Este fenotipo coincide con los de las plantas *35S::MIM156* y *pSPL9::rSPL9*, que muestran un incremento en los niveles de RAV1 (Fig. 11 y 14) y producen hojas lentamente (Fig. 22), al igual que las *35S::RAV1* (Hu et al., 2004); mientras que las plantas *35S::MIM172*, que expresan menos RAV1 (Fig. 17), producen hojas ligeramente más rápido que las plantas silvestres (Fig. 22).

Como cierre de este capítulo, la tabla 11 muestra un resumen de los diferentes fenotipos observados en el conjunto de las plantas con las que hemos trabajado.

Genotipo	Fenotipos		Producción de hojas	
	Floración	Juvenilidad	Ratio producción hojas	Plastocrono
Col-0	WT	WT	WT	WT
<i>tem1-1</i>	Temprano	WT	Ligeramente rápida	Corto
<i>tem2-2</i>	Temprano	WT	-	-
<i>tem1 tem2</i>	Temprano	Fase juvenil acortada	Rápida	Corto
<i>rav1-1</i>	Temprano?	WT	Ligeramente rápida	Corto
<i>35S::TEM1</i>	Tardío	Fase juvenil extendida	Lenta	Largo
<i>35S::MIR156</i>	Tardío	Fase juvenil extendida	Rápida	Corto
<i>35S::MIM156</i>	Temprano	Fase juvenil acortada	Lenta	Largo
<i>pSPL9::rSPL9</i>	Temprano	Fase juvenil acortada	Lenta	Largo
<i>spl9 spl15</i>	Tardío	Fase juvenil extendida	Ligeramente rápida	Corto
<i>35S::MIM172</i>	Tardío	Fase juvenil extendida	Ligeramente rápida	Corto

**Tabla 11. Resumen de los fenotipos observados a lo largo de este capítulo**



## CONCLUSIONES

1. TEM1 regula positivamente, aunque de forma débil, los niveles de miR156 en LD. Podría existir un bucle de retroalimentación positivo entre TEM1 y miR156 en el que TEM1 parece regular la expresión de miR156 de manera directa o indirecta, y una posible regulación post-transcripcional de TEM1 por miR156.
2. Los resultados del tiempo de floración del cruce realizado entre las plantas *tem1* y *35S::MIR156* indican que miR156 requiere a TEM1 para regular el tiempo de floración, ya que las plantas *tem1 35S::MIR156* presentan un fenotipo de floración temprana similar al del mutante sencillo *tem1* en LD.
3. No hemos observado cambios en los niveles de mRNA de *TEM1* o *TEM2* en las plantas sobre-expresantes o *mimicry* de miR156 en SD a lo largo del desarrollo, lo que sugiere que miR156 no regula esos niveles..
4. TEM1 y TEM2 reprimen, mediante unión directa, la expresión de *SPL9*, en LD. De esta manera, controlan a SPL9 en paralelo a la función que ejerce miR156.
5. TEM1 y TEM2 reprimen la expresión de *MIR172C*, aunque sólo hemos observado unión directa de TEM1, en LD. Esta regulación asegura un control indirecto de otros componentes de la ruta, como los represores AP2 y, a través de los bucles de retroalimentación, de SPL9 y miR156.
6. Además de regular directamente a *SPL9* y miR172, TEM1 y TEM2 los regulan probablemente también de forma indirecta a través de su efecto en miR156.
7. miR156 afecta a los niveles de mRNA de *RAV1* en SD, reduciéndolos. Además, la sobre-expresión de SPL9 los aumenta y el déficit de miR172 los reduce.
8. La regulación que ejercen los genes *TEM* sobre miR156, *SPL9* y miR172, y el hecho de que TEM1 sea necesario para el efecto de *35S::miR156* en la floración, demuestra que los genes *TEM* juegan un papel clave en la regulación de la floración a través de la ruta de la edad, controlando el proceso en distintos puntos de la ruta genética.
9. Los genes *TEM1* y *TEM2* regulan la duración de las fases juvenil y adulta, probablemente a través de su efecto en los niveles de *SPL9*.
10. TEM1 y TEM2 regulan la velocidad de producción de las hojas de manera independiente de la acción de miR156 y SPL9. Sin embargo, el efecto de RAV1 sí podría depender de éstos.
11. RAV1 parece tener un ligero efecto en el tiempo de floración en SD a 22°C aunque son necesarios experimentos adicionales para determinar su implicación.

**LITERATURA CITADA**

- Addo-Quaye, C., Eshoo, T. W., Bartel, D. P., & Axtell, M. J. (2008). Endogenous siRNA and microRNA targets identified by sequencing of the Arabidopsis degradome. *Current Biology*, *18*(10), 758–762.
- Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-Like target genes. *The Plant Cell*, *15*, 2730–2741.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*, 281–297.
- Barton, M. . (2010). Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Developmental Biology*, *341*(1), 95–113.
- Bergonzi, S., & Albani, M. (2011). Reproductive competence from an annual and a perennial perspective. *Journal of Experimental Botany*, *62*(13), 4415–4422.
- Bergonzi, S., Albani, M., Van Themaat, E., Nordström, K., Wang, R., Schneeberger, K., ... Coupland, G. (2013). Mechanisms of Age-Dependent Response to Winter Temperature in Perennial Flowering of *Arabis alpina*. *Science*, *340*(6136), 1094–1097.
- Blázquez, M. A., Ahn, J. H., & Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, *33*(2), 168–171.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R., & Meyerowitz, E. M. (1989). Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *1*(1), 37–52.
- Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*, *320*(5880), 1185–1190.
- Cardon, G. H., Hohmann, S., Nettekheim, K., Saedler, H., & Huijser, P. (1997). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3 a novel gene involved in the floral transition. *The Plant Journal*, *12*(2), 367–377.
- Cardon, G., Höhmann, S., Klein, J., Nettekheim, K., Saedler, H., & Huijser, P. (1999). Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene*, *237*(1), 91–104.
- Castillejo, C., & Pelaz, S. (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology*, *18*(17), 1338–1343.
- 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.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science*, *303*(5666), 2022–2025.
- Chien, J. C., & Sussex, I. M. (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology*, *111*(4), 1321–1328.
- Cho, H. J., Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, J.-H., Park, C.-M., & Ahn, J. H. (2012). SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, *586*(16), 2332–2337.
- Domagalska, M. A., & Leyser, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *12*(4), 211–221.
- Fornara, F., & Coupland, G. (2009). Plant phase transitions make a SPLash. *Cell*, *138*(4), 625–627.
- Fowler, S. G., Cook, D., & Thomashow, M. F. (2005). Low Temperature Induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 Is Gated by the Circadian Clock. *Plant Physiology*, *137*, 961–968.
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., ... Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, *39*(8), 1033–1037.
- Galvão, V. C., Horrer, D., Küttner, F., & Schmid, M. (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, *139*(21), 4072–4082.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Höhmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H., & Huijser, P. (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene

- SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal*, 49(4), 683–693.
- Guo, A.-Y., Zhu, Q.-H., Gu, X., Ge, S., Yang, J., & Luo, J. (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*, 418(1-2), 1–8.
- Hu, Y. X., Wang, Y. X., Liu, X. F., & Li, J. Y. (2004). Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research*, 14(1), 8–15.
- Huijser, P., & Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, 138(19), 4117–29.
- Ikeda, M., & Ohme-Takagi, M. (2009). Identification of novel transcriptional repressors. *Plant and Cell Physiology*, 50(5), 970–975.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *Journal of Cellular Physiology*, 210(2), 279–289.
- Jung, J.-H., Ju, Y., Seo, P. J., Lee, J.-H., & Park, C.-M. (2012). The SOC1-SPL module integrates photoperiod and gibberellic acid signals to control flowering time in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 69(4), 577–588.
- Jung, J.-H., Seo, P. J., Ahn, J. H., & Park, C.-M. (2012). Arabidopsis RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(19), 16007–16016.
- Jung, J.-H., Seo, P. J., Kang, S. K., & Park, C.-M. (2011). miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in Arabidopsis developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, 76(1-2), 35–45.
- Jung, J.-H., Seo, Y.-H., Seo, P. J., Reyes, J. L., Yun, J., Chua, N.-H., & Park, C.-M. (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(9), 2736–2748.
- 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.
- Kawakatsu, T., Itoh, J.-I., Miyoshi, K., Kurata, N., Alvarez, N., Veit, B., & Nagato, Y. (2006). PLASTOCHRON2 Regulates Leaf Initiation and Maturation in Rice. *The Plant Cell*, 18(3), 612–625.
- Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P., & Ahn, J. H. (2012). The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 159(1), 461–478.
- Kim, S., Soltis, P. S., Wall, K., & Soltis, D. E. (2006). Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 23(1), 107–120.
- Kim, W., Ahn, H. J., Chiou, T.-J., & Ahn, J. H. (2011). The role of the miR399-PHO2 module in the regulation of flowering time in response to different ambient temperatures in Arabidopsis thaliana. *Molecules and Cells*, 32(1), 83–88.
- Klein, J., Saedler, H., & Huijser, P. (1996). A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the Antirrhinum majus floral meristem identity gene SQUAMOSA. *Molecular Genetics & Genomics*, 250(1), 7–16.
- Lamoreaux, R. ., Chaney, W. ., & Brown, K. . (1978). The plastochron index: a review after two decades of use. *American Journal of Botany*, 65, 586–593.
- Lee, H., Yoo, S. J., Lee, J. H., Kim, W., Yoo, S. K., Fitzgerald, H., ... Ahn, J. H. (2010). Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 38(9), 3081–3093.
- Lohmann, D., Stacey, N., Breuninger, H., Jikumaru, Y., Müller, D., Sicard, A., ... Lenhard, M. (2010). SLOW MOTION is required for within-plant auxin homeostasis and normal timing of lateral organ initiation at the shoot meristem in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(2), 335–348.
- Martínez, N., Ow, M., Barrasa, I., Hammell, M., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., ... Walhout, A. (2008). A C. elegans genome-scale microRNA network contains composite feedback motifs with high flux capacity. *Genes & Development*, 22(18), 2535–2549.

- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., & Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biology*, *7*(7), 1–15.
- 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*(808), 1–8.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J., & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in Arabidopsis thaliana. *Current Biology*, *12*, 1484–1495.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harbor. Perspectives in Biology*, *2*(5), a001446.
- Poethig, R. S. (2003). Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science*, *301*, 334–336.
- Poethig, R. S. (2009). Small RNAs and developmental timing in plants. *Current Opinion in Genetics & Development*, *19*, 374–378.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes & Development*, *16*, 1616–1626.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., & Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant MicroRNA targets. *Cell*, *110*, 513–520.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S., PApe, U., Demar, M., Vindron, M., ... Lohmann, J. (2005). A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nature Genetics*, *37*(5), 501–506.
- Schmid, M., Uhlenhaut, N., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D., & Lohmann, J. (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development*, *130*(24), 6001–6012.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *18*, 1121–1133.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, D. (2005). Specific effects of MicroRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, *8*, 517–527.
- Schwarz, S., Grande, A. E. V., Bujdosó, N., Saedler, H., & Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, *67*, 183–195.
- Telfer, A., Bollman, K. M., & Poethig, R. S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in Arabidopsis thaliana. *Development*, *124*, 645–654.
- Todesco, M., Rubio-somoza, I., Paz-Ares, J., & Weigel, D. (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of MicroRNA function in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, *6*(7), 1–10.
- Usami, T., Horiguchi, G., Yano, S., & Tsukaya, H. (2009). The more and smaller cells mutants of Arabidopsis thaliana identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development*, *136*(6), 955–964.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, *136*(4), 669–687.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., ... Schmid, M. (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in Arabidopsis thaliana. *Science*, *339*(6120), 704–707.
- Wang, J.-W., Czech, B., & Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. *Cell*, *138*(4), 738–749.
- Wang, J.-W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E., & Weigel, D. (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*, *20*(5), 1231–1243.
- Wang, Y., Hu, Z., Yang, Y., Chen, X., & Chen, G. (2009). Function annotation of an SBP-box gene in Arabidopsis based on analysis of co-expression networks and promoters. *International Journal of molecular Sciences*, *10*(1), 116–132.
- 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.
- Wu, G., & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development*, *133*(18), 3539–3547.

- Yamaguchi, A., Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S., & Wagner, D. (2009). The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Developmental Cell*, *17*(2), 268–278.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateo, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., ... Yokoyama, S. (2004). A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors. *Journal of Molecular Biology*, *337*(1), 49–63.
- Yang, L., Conway, S. R., & Poethig, R. S. (2011). Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development*, *138*(2), 245–249.
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., & Poethig, R. S. (2013). Sugar promotes vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife*, *2*, e00260.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., ... Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. *The Plant cell*, *22*(7), 2156–2170.
- Yu, N., Cai, W.-J., Wang, S., Shan, C.-M., Wang, L.-J., & Chen, X.-Y. (2010). Temporal Control of Trichome Distribution by MicroRNA156-Targeted SPL Genes in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, *22*(7), 2322–2335.
- Yu, S., Cao, L., Zhou, C.-M., Zhang, T.-Q., Lian, H., Sun, Y., ... Wang, J.-W. (2013). Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife*, *2*, e00269.
- Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y.-C., Horrer, D., Zhang, T.-Q., Hao, Y.-H., ... Wang, J.-W. (2012). Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *The Plant Cell*, *24*(8), 3320–3332.
- Zheng, Y., Li, Y.-F., Sunkar, R., & Zhang, W. (2012). SeqTar: an effective method for identifying microRNA guided cleavage sites from degradome of polyadenylated transcripts in plants. *Nucleic Acids Research*, *40*(4), e28.
- Zhu, Q.-H., & Hellierwell, C. A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal of Experimental Botany*, *62*(2), 487–495.
- Zhuo, C., Zhang, T., Wang, X., Yu, S., Lian, H., Tang, H., ... Wang, J. (2013). Molecular basis of age-dependent vernalization in Cardamine flexuosa. *Science*, *340*(6136), 1097–1100.

## ANEXOS

Análisis de la varianza (ANOVA de 1-vía) y test para comparaciones múltiples de Bonferroni, intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Los asteriscos indican la significación estadística: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns, No significativo ( $p > 0,05$ ). NC= no concluyente con los datos obtenidos en las réplicas biológicas analizadas

**Tabla 5. Análisis del tiempo de floración en condiciones de SD**

Comparación TOTAL HOJAS	RB1			RB2			RB1+RB2
	Significación	p-valor	Significación	p-valor	Resumen		
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>rav1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0024	SÍ
Col-0 vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>rav1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,3341	NO
<i>rav1</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	*	0,0123	NO
<i>rav1</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>pSPL9::rSPL9</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1</i>				Sí	**	0,0048	
Col-0 vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>rav1</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>tem1</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>				No	ns	0,1638	
<i>tem1</i> vs. <i>spl9spl15</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>pSPL9::rSPL9</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>spl9spl15</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	> 0,9999	
	RB3			RB4			RB3+RB4
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1 tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	**	0,0097	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem1 tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1 tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ

**Tabla 5. Continuación.**

Comparación DÍAS	RB1			RB2			RB1+RB2
	Significación	p-valor	Significación	p-valor	Resumen		
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>rav1</i>	Sí	**	0,0025	No	ns	> 0,9999	NC
Col-0 vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>rav1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	0,0002	Sí	***	0,0005	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	No	ns	0,0935	Sí	*	0,0187	NO
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	0,0005	SÍ
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>pSPL9::rSPL9</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	**	0,0062	No	ns	> 0,9999	NC
Col-0 vs. <i>tem1</i>				No	ns	> 0,9999	
Col-0 vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>rav1</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>spl9spl15</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	0,3003	
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	0,4935	
<i>pSPL9::rSPL9</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>spl9spl15</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	0,4935	
	RB3			RB4			RB3+RB4
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	NC (*)
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	***	0,0004	Sí	***	0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ

**Tabla 6. Análisis del tiempo de floración en condiciones de LD.**

<b>Comparación ROSETA</b>	<b>RB1</b>			<b>RB2</b>			<b>RB1+RB2</b>
	<b>Significación</b>	<b>p-valor</b>	<b>Significación</b>	<b>p-valor</b>	<b>Resumen</b>		
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0038	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	*	0,0120	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0095	SÍ
<b>Comparación DÍAS</b>							
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	**	0,0052	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	No	ns	0,0507	Sí	**	0,0045	NC



**Tabla 7. Juvenilidad en condiciones de SD.**

Comparación JUVENILES	RB1			RB2			RB1+RB2
	Significación	p-valor		Significación	p-valor		Resumen
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	**	0,0023	Sí	**	0,0012	SÍ
Col-0 vs. <i>rav1</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
Col-0 vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,1752	NC
<i>tem1tem2</i> vs. <i>rav1</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,3636	NC
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,1546	NC
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>pSPL9::rSPL9</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1</i>				No	ns	> 0,9999	
Col-0 vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	**	0,0025	
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>				Sí	**	0,0021	
<i>tem1</i> vs. <i>rav1</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>pSPL9::rSPL9</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>spl9spl15</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	**	0,0012	
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>pSPL9::rSPL9</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	< 0,0001	
<i>spl9spl15</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	> 0,9999	
	RB3			RB4			RB3+RB4
Col-0 vs. <i>tem1</i>	No	ns	0,6102	No	ns	> 0,9999	NO
Col-0 vs. <i>tem2</i>	No	ns	0,3058	No	ns	> 0,9999	NO
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	**	0,0027	Sí	*	0,0354	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	**	0,0030	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	0,0007	No	ns	0,6887	NC
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NC

**Tabla 7. Continuación.**

Comparación ADULTAS	RB1			RB2			RB1+RB2
	Significación	p-valor	Significación	p-valor	Resumen		
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>rav1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	0,0004	SÍ
Col-0 vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>35S::MIM156</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
Col-0 vs. <i>pSPL 9::rSPL 9</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,8175	NO
Col-0 vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	*	0,0108	Sí	***	0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>rav1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pSPL 9::rSPL 9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1tem2</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,0695	NC
<i>rav1</i> vs. <i>pSPL 9::rSPL 9</i>	Sí	***	0,0002	No	ns	> 0,9999	NC
<i>rav1</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM156</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>pSPL 9::rSPL 9</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>pSPL 9::rSPL 9</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	*	0,0255	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>pSPL 9::rSPL 9</i> vs. <i>spl9spl15</i>	Sí	**	0,0038	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1</i>				Sí	***	0,0002	
Col-0 vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	***	0,0006	
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>rav1</i>				No	ns	> 0,9999	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIR156</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM156</i>				Sí	*	0,0271	
<i>tem1</i> vs. <i>pSPL 9::rSPL 9</i>				No	ns	0,3973	
<i>tem1</i> vs. <i>spl9spl15</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>tem1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>tem1tem2</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>rav1</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>35S::MIR156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>35S::MIM156</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>pSPL 9::rSPL 9</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				Sí	****	< 0,0001	
<i>spl9spl15</i> vs. <i>35S::MIM172</i>				No	ns	> 0,9999	
	RB3			RB4			RB3+RB4
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0075	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	***	0,0002	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0010	SÍ

**Tabla 8. Juvenilidad en condiciones de LD.**

<b>Comparación JUVENILES</b>	<b>RB1</b>			<b>RB2</b>			<b>RB1+RB2</b>
	<b>Significación</b>	<b>p-valor</b>		<b>Significación</b>	<b>p-valor</b>		<b>Resumen</b>
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	***	0,0002	No	ns	0,0513	NC
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	*	0,0201	No	ns	> 0,9999	NO
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	*	0,0391	Sí	*	0,020	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	No	ns	0,6822	No	ns	0,0584	NO
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,1442	NC
	<b>RB3</b>			<b>RB4</b>			<b>TODAS</b>
Col-0 vs. <i>tem1</i>	No	ns	0,6102	No	ns	> 0,9999	NO
Col-0 vs. <i>tem2</i>	No	ns	0,3058	No	ns	> 0,9999	NO
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	**	0,0027	Sí	*	0,0354	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	**	0,0030	No	ns	> 0,9999	NO
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	0,0007	No	ns	0,6887	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
	<b>RB1</b>			<b>RB2</b>			<b>RB1+RB2</b>
<b>Comparación ADULTAS</b>	<b>Significación</b>	<b>p-valor</b>		<b>Significación</b>	<b>p-valor</b>		<b>Resumen</b>
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	No	ns	0,0914	Sí	***	< 0,0001	NC
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	No	ns	0,0789	No	ns	0,2411	NO
	<b>RB3</b>			<b>RB4</b>			<b>TODAS</b>
Col-0 vs. <i>tem1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0075	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem2</i>	Sí	***	0,0002	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2</i> vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0010	NC

## **CAPÍTULO 2: SEÑALES AMBIENTALES: LUZ y TEMPERATURA**

---

## INTRODUCCIÓN

Las plantas perciben los cambios ambientales marcados por las estaciones y responden iniciando los diferentes programas de desarrollo. La luz y la temperatura determinan múltiples respuestas fisiológicas y genéticas tanto diurnas como estacionales. Aparte de las respuestas diarias a los cambios de luz y temperatura, existen procesos biológicos, como la floración, que requieren una regulación a largo plazo. La inducción floral es un proceso de desarrollo regulado estacionalmente en climas templados, en el que tanto la luz como la temperatura tienen un importante papel en su control. En la planta anual *Arabidopsis thaliana*, el incremento de la duración de los días y un incremento moderado de la temperatura ambiental promueven la floración. Estas señales externas se unen a las señales internas (hormonas, azúcares, etc.) que, en conjunto, determinan cuándo es el momento óptimo para que se produzca la floración.

La luz y la temperatura son dos de las señales externas mejor estudiadas como reguladoras de las diferentes rutas genéticas que están implicadas en la floración en *A. thaliana*. Ambas señales están estrechamente conectadas, ya que el incremento de las horas de luz conlleva un incremento de la temperatura, lo que favorece la floración. Será interesante conocer qué puede ocurrir con las pautas de floración si los efectos del cambio climático alteran estos parámetros ambientales. Pero hasta entonces, la experimentación controlada, modificando una u otra condición (la luz o la temperatura) nos permite comprender las diferentes vías del sistema.

### 1. RUTA DE LA LUZ COMO REGULADORA DE LA FLORACIÓN

La calidad, cantidad y dirección de la luz y el fotoperiodo forman un paquete de información que las plantas integran como información espacial, temporal y estacional para modular múltiples respuestas fisiológicas, desde la germinación a la floración, pasando por la arquitectura de la planta (longitud de los peciolo, elongación del tallo, etc.). La medición de todos estos parámetros permite a las plantas regular multitud de procesos del desarrollo a lo largo de su ciclo vital, entre ellos el inicio de la reproducción (Franklin & Whitelam, 2005).

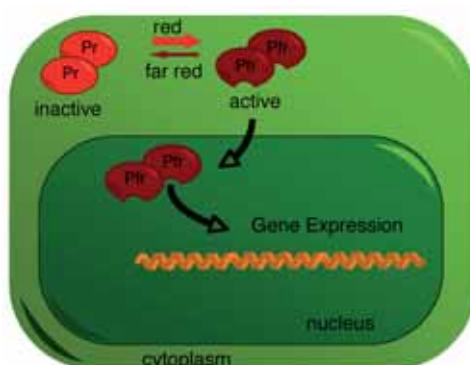
Como se ha descrito en la introducción general, las plantas perciben las señales lumínicas a través de los fotorreceptores. Existen varios tipos de fotorreceptores según la longitud de onda a la que absorben. Nos centraremos en el papel de los fitocromos, especialmente del fitocromo B (phyB), como reguladores de la floración. Sin embargo, no son los únicos fotorreceptores implicados en el control del tiempo de floración.

#### 1.1 Percepción de la luz por los fotorreceptores: fitocromos

En *Arabidopsis*, los fitocromos conforman una familia de fotorreceptores de cinco miembros: phyA, phyB, phyC, phyD y phyE, los cuales perciben la luz roja y la luz roja lejana (Mathews & Sharrock, 1997). La caracterización de estos 5 tipos de fitocromo ha permitido determinar que phyB y phyD comparten un 80% de identidad de secuencia aminoacídica y son más parecidos a

phyE que phyA y phyC. Por ello, se considera dentro de un mismo grupo a phyB, phyD y phyE (Goosey et al., 1997; Sharrock & Quail, 1989). Otra diferencia entre los distintos fitocromos es que phyA pertenece al grupo de los fitocromos de tipo I (fotolábiles), mientras que phyB-E son del tipo II (fotoestables). La fotolabilidad de phyA sugiere que éste intervendría en las transiciones de oscuridad a luz, como los ciclos noche-día, y en condiciones de sombra, cuando las plantas crecen bajo cobertura vegetal y el ambiente se enriquece en luz roja lejana; mientras que los fitocromos fotoestables participan en los procesos de desarrollo en los que las plantas crecen en condiciones de luz (revisado en Neff et al., 2000; Smith, 2000). Se ha determinado que phyA y phyB tienen una expresión ubicua y están presentes en prácticamente todos los tejidos (epidermis, mesófilo y tejido vascular de las hojas) y durante todos los momentos del desarrollo (Somers & Quail, 1995).

Todos los tipos de fitocromo se sintetizan en una forma inactiva (Pr) capaz de absorber, mayoritariamente, luz roja y se localizan en el citosol de la célula. Cuando las células captan la luz roja (R), los fitocromos se convierten a la forma activa (Pfr), en un proceso denominado fotoconversión. En su forma activa, los fitocromos absorben luz roja lejana (FR, del inglés *far red*) y son translocados al núcleo, lo que permite su interacción con los elementos que inician la transducción de la señal (revisado en Nagatani, 2004) (Fig. 26), y con ello la regulación de numerosos genes implicados en multitud de procesos del desarrollo, entre ellos la floración (Devlin et al., 2003; Tepperman et al., 2004).



**Figura 26. La luz controla la localización subcelular de los fitocromos**

En el citoplasma celular, la luz roja convierte a los fitocromos de su forma inactiva (Pr) a activa (Pfr), la cual se transloca al núcleo, donde se acumula y modula la expresión génica. Extraído de la página web del grupo del Dr. C. Fankhauser, [www.unil.ch](http://www.unil.ch)

En condiciones de luz natural, los fitocromos monitorizan los cambios en la calidad de la luz que perciben, lo que podemos expresar mediante el ratio R/FR (porcentaje de luz roja/luz roja lejana), el cual representa la cantidad total de fitocromo en su forma activa (Pfr)/inactiva (Pr). Cuando las plantas crecen bajo cobertura vegetal, la luz que reciben viene reflejada de la superficie de otras plantas. Eso provoca que el ratio entre luz roja y luz roja lejana (R/FR) esté desplazado hacia el rojo lejano ( $R < FR$ ), los fitocromos detectan ese cambio en la calidad de la luz que recibe la planta, y se activan una serie de respuestas como el alargamiento de tallos y pecíolos y, si las condiciones son persistentes, el adelanto de la floración, entre otros (Fig. 27) Cuando las plantas

deficientes en *phyB* crecen en condiciones de luz blanca (con un ratio  $R > FR$ ), presentan esas mismas características (algo atenuadas), en lo que se han descrito como respuestas de síndrome de huida de la sombra constitutivas (revisado en Franklin & Whitelam, 2005).



**Figura 27. La luz roja lejana induce la floración y otras respuestas de crecimiento en sombra**

Fenotipos de floración plantas cultivadas en condiciones de luz roja (izquierda) o luz roja lejana (derecha). El desplazamiento del ratio  $R/FR$  hacia el rojo lejano ( $R < FR$ ) induce las respuestas a condiciones de sombra, entre otras la inducción temprana de la floración. Extraído de (Franklin & Whitelam, 2005).

## 1.2 Ruta de la calidad de la luz y floración

Los múltiples estudios sobre los componentes implicados en respuestas a la calidad de la luz han generado una gran cantidad de información centrada en las etapas tempranas del desarrollo (germinación y elongación del hipocotilo), sin embargo el conocimiento sobre los genes implicados en la regulación de la inducción de la floración es más reducido.

En condiciones de  $R < FR$ , en las cuales se activan las respuestas mediadas por *phyA* y se reprimen las mediadas por *phyB-phyE* (R. a Sharrock & Quail, 1989), se ha observado una variedad de respuestas fotomorfogénicas, entre las cuales se encuentra una aceleración de la floración. En el aspecto molecular, se ha observado un incremento en la expresión y actividad de *CO* durante las primeras horas de la mañana y en las últimas horas del día. En estas condiciones de bajo  $R/FR$ , la actividad de *PHYB* está reducida, por lo que *CO* es estable durante la mañana y puede activar a *FT* aún en condiciones poco favorables de SD, y adelantar la floración (Cerdán & Chory, 2003).

El concepto de ruta de la calidad de la luz (definida por la proporción  $R:FR$ ), como ruta independiente del control de la floración, fue propuesta a partir del descubrimiento de los cambios de expresión de dos integradores florales, *LFY* y *FT* en plantas *phyB* (Blázquez & Weigel, 1999; Halliday et al., 2003). Parece que esta ruta de *phyB* controla los niveles de *FT* de manera independiente de *CO* (Bäckstrom et al., 2007; Cerdán & Chory, 2003; Iñigo et al., 2012).

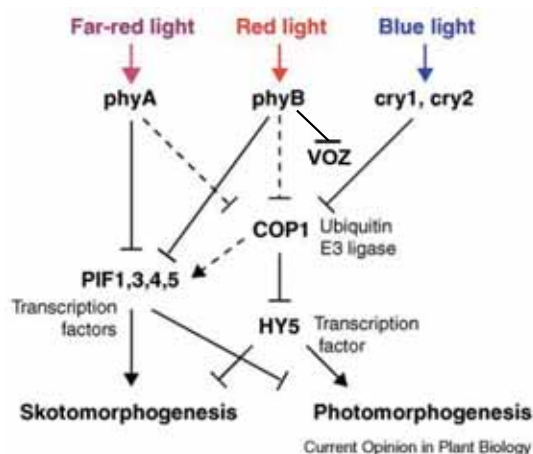
El fitocromo *phyB* se caracteriza por ser un represor de la floración tanto en condiciones de LD como de SD, al contrario que *phyA*, que acelera la floración únicamente en LD (revisado en Franklin & Quail, 2010). Ambos tipos de fitocromo integran la información del fotoperiodo y de la calidad de la luz que reciben y la transducen al reloj circadiano, para regular la expresión de *CO*

(Suárez-López et al., 2001; Valverde et al., 2004; Yanovsky & Kay, 2002). Como ya sabemos, CO es un componente esencial de la ruta del fotoperiodo al activar a *FT* y *SOC1* para promover la floración en condiciones de LD (Samach et al., 2000; Yanovsky & Kay, 2002). La activación transcripcional de *FT* por CO parece ocurrir específicamente en el tejido vascular de las hojas, donde se expresan ambos (An et al., 2004; Takada & Goto, 2003). Experimentos con líneas de "enhancer trap" phyB-GFP han revelado que phyB regula desde el mesófilo la expresión de *FT* en el tejido vascular, mientras que no lo hace desde el tejido vascular. Este resultado sugiere que es necesaria una señalización entre tejidos, desde el mesófilo hasta el sistema vascular, para que se produzca la regulación de la floración a través de phyB (Endo et al., 2005). En resumen, la luz no sólo regula las respuestas dependientes del reloj circadiano (y por tanto del fotoperiodo), sino que también las modula aquellas que dependen de la calidad y cantidad que las plantas reciben en un ambiente determinado.

### **1.3 Componentes de la señalización mediada por phyB**

Estudios genéticos, bioquímicos y moleculares han permitido identificar reguladores positivos y negativos en la ruta de señalización de los fitocromos. Existen componentes específicos de la señalización mediada por phyA (desencadenada por luz roja lejana) o por phyB (desencadenada por luz roja); sin embargo algunos de ellos son comunes para ambos. Así, las señales lumínicas que perciben los fitocromos son integradas y transducidas a través de varios tipos de factores de interacción directos, como la conocida familia de reguladores transcripcionales *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs)* y los recientemente descritos *VASCULAR PLANT ONE-ZING FINGER 1 y 2 (VOZ1 y VOZ2)* (Yasui et al., 2012), y otros indirectos como *ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5)* (Oyama, Shimura, & Okada, 1997) (Fig. 28), además de *GIGANTEA (G)*, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, cuya regulación está mediada por COP1 (revisado recientemente en (Lau & Deng, 2012), y *PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME1 (PFT1)*, que actúa como regulador positivo de la floración por debajo de phyB (Cerdán & Chory, 2003) y forma parte del complejo multiproteico Mediator (subunidad MED25), el cual promueve la floración a través de mecanismos dependientes e independientes de CO (Bäckström et al., 2007; Iñigo et al., 2012).





**Figura 28. Modelo simplificado de la señalización de la ruta de la luz**

Se muestran las interacciones de los fotorreceptores phyA, phyB, cry1 y cry2 con las proteínas a las que regulan directa (líneas sólida) o indirectamente (líneas discontinuas). Centrándonos en la regulación mediada por phyB, ésta es directa sobre los factores de transcripción PIF y VOZ e indirecta sobre HY5. Modelo modificado, extraído de Lau & Deng, 2010.

### 1.3.1 Phytochrome Interacting Factors (PIF): PIF4 y PIF5

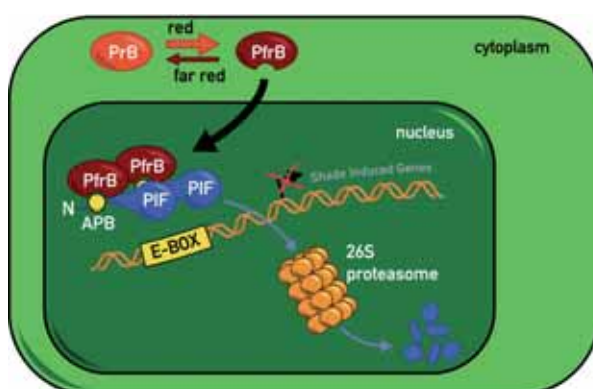
Los PIFs fueron los primeros factores con interacción directa con los fitocromos en describirse. Estos factores de transcripción conforman una extensa familia del tipo *bHLH* (*basic helix-loop-helix*), se unen directamente a la forma activa de los fitocromos y son capaces de controlar la expresión de diversos genes regulados por la luz, de manera directa e indirecta para actuar como inhibidores de la fotomorfogénesis (Pablo Leivar et al., 2008). Algunos de los miembros más conocidos son *PIF1*, *PIF3*, *PIF4*, *PIF5* y, más recientemente, *PIF7*. Otro miembro *bHLH*, que no pertenece al sub-grupo de los PIFs, es LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1 (HFR1), el cual también está implicado en la señalización mediada por fitocromos, aunque no interacciona directamente con ellos (revisado en Castillon et al., 2007).

Sin entrar a detallar las interacciones concretas entre todos ellos, sí hay que destacar que muestran una afinidad diferenciada en su unión con las formas activas de los fitocromos. PIF1 y PIF3 muestran una mayor afinidad de unión con phyA y phyB, mientras que PIF4, PIF5 y PIF6 se unen únicamente con phyB (Huq et al., 2004; Khanna et al., 2004).

Una característica común a todos los PIFs es su unión a las regiones promotoras del DNA en una secuencia conocida como E-box (CANNTG). Hay diferentes tipos de E-box, y se ha establecido la preferencia de los PIFs por unirse a un motivo particular denominado G-box (CACGTG) (Martínez-García et al., 2000). Muy recientemente se ha descrito una secuencia G-box modificada, denominada PBE-box (CACATG), la cual parecen reconocer PIF1, PIF3 y PIF4 (Zhang et al., 2013).

La regulación de los PIFs está ligada al tipo de función que desarrollan. La interacción con los fitocromos en su forma activa se produce durante el periodo de luz; en ese momento, la unión phy-PIF promueve la degradación de los PIF. Es decir, su actividad está reducida en condiciones de luz

de manera dependiente del fitocromo (Fig. 29). Dicha degradación se produce a través del sistema ubiquitina-proteosoma 26S, lo que indica que su función se desarrolla durante el periodo nocturno, cuando se ha comprobado que se acumulan en el núcleo (Shen et al., 2005). Además, parece existir una regulación mutua entre phyB y PIF (en un bucle de retroalimentación negativo) después de una exposición prolongada a luz roja, de manera que los PIFs también pueden actuar modulando la abundancia de phyB, por ello mutantes *pif4* y *pif5* muestran niveles más altos de phyB (Jang et al., 2010; Leivar et al., 2008). Por otra parte, COP1 (complejo COP1/DET/FUS), otro regulador negativo de la señal lumínica, es importante para su estabilidad en la oscuridad (Bauer et al., 2004), probablemente porque promueve la degradación de los fitocromos (Jang et al., 2010; Seo et al., 2004).



**Figura 29. Mecanismo de regulación de phyB sobre los factores PIF en condiciones de luz**

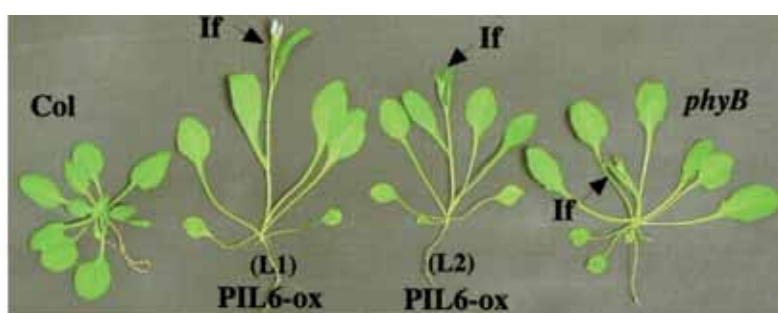
Los fitocromos son sintetizados en su forma inactiva (Pr), la cual se activa por efecto de la luz roja y se convierte en la forma activa (Pfr), la cual se acumula en el núcleo. En condiciones de luz, los fitocromos interactúan con los factores de transcripción PIF promoviendo su degradación proteolítica en el proteosoma. Extraído de la página web del grupo del Dr. C. Fankhauser, [www.unil.ch](http://www.unil.ch)

Aparte de la degradación mediada por los fitocromos, los PIFs también están regulados por el reloj circadiano, la temperatura, otros *bHLH* como HFR1 y por la ruta de señalización de las hormonas giberelinas (GAs), con las proteínas DELLA actuando como moduladores negativos de la actividad de las proteínas PIF (revisado en Leivar & Quail, 2011).

Este tipo de regulación dependiente de la luz está relacionada con las funciones biológicas que desempeñan los PIFs, al promover respuestas escotomorfogénicas, como reguladores negativos de la fotomorfogénesis. El desarrollo escotomorfogénico se caracteriza por un crecimiento rápido del hipocotilo, unos cotiledones pequeños, sin pigmentos, cerrados y plegados sobre sí mismos formando un gancho apical. Todo ello confiere a las plántulas una apariencia etiolada. Es decir, los PIFs controlan principalmente los procesos que tienen que ver con las primeras fases de exposición a la luz después de la germinación, como la elongación del hipocotilo, expansión de los cotiledones, gravitropismo en oscuridad y biosíntesis de clorofila y antocianinas (revisado en Josse & Halliday, 2008).

El estudio de los mutantes sencillos ha permitido establecer que, aunque comparten una secuencia muy similar, desarrollan distintas funciones biológicas, en algunos casos solapantes (revisado en (Castillon et al., 2007; Leivar & Quail, 2011).

Nuestro interés se ha centrado en PIF4 y PIF5, los cuales han sido implicados además en el control de la floración (Fujimori et al., 2004; Kumar et al., 2012). Inicialmente, se describió que la sobre-expresión de *PIF5* (*PIL6*) tiene un claro efecto en la floración, al florecer incluso más temprano que los mutantes *phyB* en condiciones de LD y SD a 22°C (Fig. 30) (Fujimori et al., 2004). Sin embargo, no se han detectado diferencias significativas respecto a las plantas silvestres en los mutantes sencillos *pif1*, *pif3*, *pif4* y *pif5* ni en el cuádruple mutante *pifQ* (*pif1 pif3 pif4 pif5*) cuando son cultivados en condiciones de LD (Shin et al., 2009).



**Figura 30. Fenotipo de floración temprana de las plantas 35S::*PIF5***

Las plantas sobre-expresantes *PIF5* (*PIL6-ox*) presentan un fenotipo de floración temprana en condiciones de cultivo de luz blanca, en LD y SD a 22°C. Además presentan un fenotipo de arquitectura de la planta muy similar al de las plantas *phyB* mutantes. Extraído de Fujimori et al., 2004.

Recientemente se ha descrito la implicación de PIF4 en la inducción de la floración en condiciones de SD y alta temperatura ambiental (28°C), al inducir a *FT* independientemente de CO (Kumar et al., 2012). Anteriormente ya se había identificado a PIF4 como mediador de las adaptaciones de la arquitectura de la planta a las altas temperaturas, pero se había descartado su implicación en la regulación del tiempo de floración al cultivar plantas silvestres y mutantes *pif4* a 22°C y transferirlas a 28°C en condiciones de luz continua (Koini et al., 2009). Probablemente, la diferencia entre ambos estudios se basan en las condiciones de cultivo, ya que en condiciones de luz continua, los PIF no pueden acumularse. Además, mediante estudios de variación natural en el locus de *PIF4*, se ha asociado la variación natural en este locus con variaciones cuantitativas del tiempo de floración en poblaciones naturales (Brock et al., 2010).

De interés para nuestro estudio es la reciente publicación de un trabajo donde se ha combinado la inmunoprecipitación de la cromatina con la secuenciación masiva (ChIP-seq) para identificar sitios de unión de PIF4 y PIF5 para así detectar nuevos genes diana directos de estos factores de transcripción en condiciones de R<FR (Hornitschek et al., 2012). En este trabajo se ha identificado un posible sitio de unión en la secuencia codificante de *TEM2*, aunque la unión no ha sido testada por otros métodos.

### 1.3.2 Vascular One-Zinc finger (VOZ)

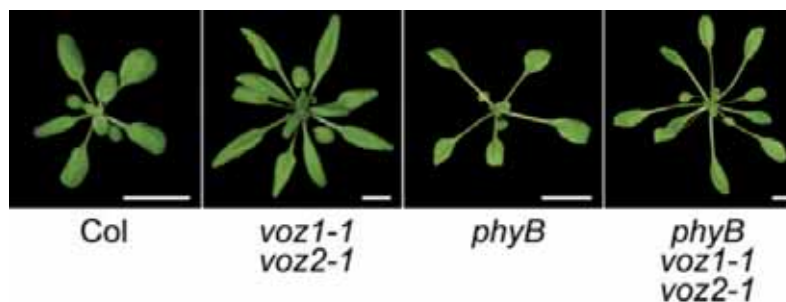
Las proteínas VOZ han sido recientemente implicadas en el control de la floración al interactuar con *phyB* y regular positivamente la expresión de *FT* y negativamente la de *FLC* (y de otros reguladores de FLC) de manera indirecta (Celesnik et al., 2013; Yasui et al., 2012).

Los factores de transcripción VOZ pertenecen a un subgrupo de proteínas NAC y presentan dos dominios, el dominio A y el dominio B. Éste último, también denominado dominio VOZ que se sitúa en la región C-terminal, contiene un motivo *Zinc-Finger* y una región básica, y es el dominio con capacidad de unión al DNA, además de ser el que permite la dimerización de VOZ2, facilitando así la unión al DNA. Ambas proteínas comparten una similitud en la secuencia aminoacídica del 53% (Mitsuda et al., 2004).

El análisis de los promotores de *VOZ1* y *VOZ2* fusionados a GUS ha permitido visualizar su expresión mayoritariamente en el sistema vascular de varios tejidos, especialmente en el floema (*VOZ1*) y en el mesófilo (*VOZ2*), además de otros tejidos como raíces y anteras (Mitsuda et al., 2004; Yasui et al., 2012). La degradación de las proteínas VOZ se produce mediante el sistema de ubiquitina-proteosoma 26S (Nakai et al., 2013), aunque la estabilidad de la proteína VOZ2 en el núcleo también parece estar modulada por la luz de manera dependiente de *phyB*, con quien parece interactuar en el citoplasma en condiciones de R<FR (Yasui et al., 2012).

Los estudios *in vitro* de la proteína VOZ2 han permitido describir el sitio de unión por reconocimiento de la secuencia palindrómica GCGT-N7-ACGC; parece que VOZ1 podría unirse al mismo motivo pero no se ha testado experimentalmente (Mitsuda et al., 2004). Aunque este motivo parecía no admitir mutaciones en la secuencia palindrómica, pero sí en la secuencia variable central, recientemente se han identificado las secuencias subóptimas de unión GCGT-N7-ACG**T** y GCGT-N**8**-ACGC (Celesnik et al., 2013).

En relación con su función como inductores de la floración, el doble mutante *voz1 voz2* retrasa considerablemente la floración en hojas y días en condiciones de LD pero sólo es ligeramente tardío en días y no en hojas en SD; mientras que los mutantes sencillos no parecen presentar ningún fenotipo evidente en ninguno de los dos fotoperíodos (Celesnik et al., 2013; Yasui et al., 2012). Además, el doble mutante *voz1 voz2* es capaz de suprimir el efecto de floración temprana de las plantas *phyB*, al reducir los niveles de *FT* sin afectar prácticamente a los niveles de CO. Sin embargo no es capaz de suprimir otros fenotipos relacionados con la falta de *phyB* (Fig. 31) (Yasui et al., 2012). En relación con *FLC*, las plantas *voz1 voz2* presentan una mayor expresión de FLC en comparación con las plantas silvestres en condiciones de LD 22°C, lo que podría provocar el descenso en la expresión de *FT*. Sin embargo, ninguno de los dos presenta la secuencia palindrómica que reconocen los VOZ por lo que su regulación parece ser indirecta.



**Figura 31. Fenotipo de floración tardía de los mutantes *voz* en LD**

Los mutantes *voz* presentan un fenotipo de floración tardía en condiciones de LD. El cruzamiento del doble mutante *voz* con plantas deficientes en *phyB* provoca un retraso de la floración que indica que las proteínas VOZ están controladas por *phyB* y promueven la floración. Extraído de Yasui et al., 2012.

## 2. RUTA DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL

La temperatura es otra de las señales ambientales que las plantas usan para determinar el momento de la inducción floral. Ésta afecta a las plantas de dos formas: (1) las bajas temperaturas (0-4°C) son necesarias para las plantas que requieren un periodo de frío para florecer en la siguiente temporada favorable (este periodo se conoce como vernalización) (revisado en Kim et al., 2009), y (2) las temperaturas moderadas que experimentan a lo largo de su desarrollo también regulan los cambios de fase del desarrollo, como la floración, además de otros procesos del desarrollo (Penfield, 2008).

Por tanto, además de la regulación por el fotoperiodo, el momento de inicio de la floración está controlado por la temperatura a la que crecen las plantas: las altas temperaturas (asociadas a los periodos con más horas de luz, como la primavera) promueven la floración, mientras que las bajas temperaturas (asociadas a un fotoperiodo corto, como el otoño) son capaces de retrasarla. El estudio del control por la temperatura en *Arabidopsis* ha permitido testar situaciones combinadas de fotoperiodo y temperatura. Es decir, condiciones de fotoperiodo favorable (días largos) y temperaturas bajas (16°C) y condiciones de fotoperiodo no favorable (días cortos) y altas temperaturas (27°C). Cada vez tenemos más datos sobre cuáles son los mecanismos moleculares que desencadenan el inicio de la floración, como consecuencia de la plasticidad de las plantas para adaptarse a cambios de temperatura que no se correlacionan con un cambio en el fotoperiodo. El conocimiento acumulado sobre los mecanismos que controlan la floración a baja temperatura contrasta con los pocos, aunque crecientes, datos que tenemos acerca de la floración a altas temperaturas.

A pesar de que cada vez se conocen más datos sobre la percepción y efecto de la temperatura sobre la fisiología y desarrollo de las plantas, sigue siendo poco conocido el mecanismo mediante el cual las plantas detectan diferencias moderadas en la temperatura. Se cree que el mecanismo de regulación podría ser epigenético (Turck & Coupland, 2011), al haberse detectado cambios de conformación en la cromatina por efecto de la temperatura y conocerse el papel de la histona H2A.Z para detectar los cambios en la temperatura ambiental (Kumar & Wigge, 2010).

Los cribados genéticos han permitido identificar algunos mutantes que no parecen estar afectados por cambios en la temperatura (es decir, son insensibles a la temperatura). Los genes correspondientes responden al incremento o descenso de la temperatura para activar o reprimir a las moléculas capaces de inducir la floración. Entre estos reguladores se conoce bien la función de los factores de transcripción de la familia MADS-box SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) y FLOWERING LOCUS C (FLC), y la de los genes de la vía autónoma *FCA/FVE*, todos ellos actuando a temperaturas moderadamente bajas de 16°C (Blázquez et al., 2003; Lee et al., 2007). Además, cada vez se tienen más datos sobre la implicación de algunos miRNAs en el control de la floración mediada por las bajas temperaturas a través del módulo regulador formado por miR156 y *SPL3* (Kim et al., 2012). Actuando a altas temperaturas, se ha descrito el rol de *FLOWERING LOCUS M (FLM)* (otro gen de la familia MADS-box) y el de PIF4 (Balasubramanian et al., 2006; Kumar et al., 2012).

Finalmente, todas estas señales acaban regulando a los inductores florales, siendo el principal de ellos *FT*. De esta forma, el tiempo de floración se correlaciona inversamente con los niveles de *FT* y estos se correlacionan positivamente con la temperatura, de manera que las temperaturas altas promueven un incremento en los niveles de *FT*, y con ello, un adelanto de la floración; mientras que las temperaturas bajas reducen los niveles de *FT* y provocan un retraso de la floración. En ambas condiciones, los cambios en los niveles de *FT* no responden a cambios en los niveles de *CO*, que permanecen inalterados en las distintas temperaturas. Por ello, es muy tentador pensar que la temperatura pueda controlar los niveles de *TEM* y que esto resulte en la variación de los niveles de *FT* pese a no verse afectados los de *CO*.

## **2.1 Regulación de la floración por bajas temperaturas en condiciones favorables de fotoperiodo (LD y 16°C)**

Uno de los primeros trabajos sobre el estudio de la temperatura ambiental (16°C frente a 23°C, en condiciones de LD) se centra en el efecto de la baja temperatura en una serie de mutantes de las rutas del fotoperiodo, las giberelinas y la vía autónoma. Entre los mutantes estudiados se observó que las plantas que tenían afectados los genes de la vía autónoma (*FCA* y *FVE*) no respondían a las bajas temperaturas y florecían con el mismo número de hojas a 16°C y a 23°C. Esta observación indica que la floración de estos mutantes es insensible a la temperatura y que, por tanto, los genes correspondientes son necesarios para percibir los cambios de temperatura o responder a ellos. Se pudo establecer que el retraso en la floración a 16°C era debido a la baja actividad de *phyA* a esta temperatura (Blázquez et al., 2003). Otros estudios también apuntaban a la implicación de otros fotorreceptores en las respuestas a la temperatura, como la pérdida del fenotipo de floración temprana de los mutantes de fitocromo B (*phyB*) a 16°C (Halliday et al., 2003). Por ello se abrieron nuevas preguntas relacionadas con la percepción de la temperatura por parte de los fotorreceptores y con la integración de ambas señales externas, luz y temperatura. La interacción de estas rutas se discutirá más adelante.

Finalmente, el efecto de la baja temperatura acaba repercutiendo en la expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1*, además de sobre *TSF*, que son los que lanzan la floración (Blázquez et al., 2003; Lee et al., 2007).

### **2.1.1 Inductores florales a 16°C: genes de la familia de *FT***

Al analizar la expresión de *CO*, *FT* y *SOC1* a lo largo de 24 horas en plantas silvestres a 16°C y 23°C, se observó que *FT* y *SOC1* presentan unos valores de expresión muy bajos a bajas temperaturas, mientras que la expresión de *CO* no desciende (por lo que no parece ser responsable de la baja activación de *FT* y *SOC1* a 16°C). Además, al analizar el tiempo de floración de las plantas *35S::FT* se observó que florecían prácticamente igual a 16°C y a 23°C. Sin embargo, el mutante *ft-1* todavía sentía la temperatura, por lo que *FT* no puede ser el único gen que integre la respuesta de la temperatura (Blázquez et al., 2003). Los mismos autores observaron que un gen de la misma familia de *FT*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, se comporta de manera opuesta a éste, e incrementa su nivel de expresión a 16°C respecto a 23°C. *TSF* es un gen de la familia de *FT*, con el que comparte una alta identidad de secuencia y similares funciones bioquímicas, al interactuar con los mismos factores de transcripción bZIP (Jang et al., 2009). Comparten además activador, ya que *CO* regula a ambos genes en condiciones de LD, y patrón de expresión diurno, picando ambos en la transición día-noche, a ZT16 (Yamaguchi et al., 2005). Su sobre-expresión causa una floración temprana, al igual que la de *FT* (Kobayashi et al., 1999), aunque el mutante *tsf-1* no florece tardíamente pero sí aumenta el fenotipo de floración tardía de *ft-10*; el doble mutante *ft-10 tsf-1* es además insensible al fotoperiodo (Yamaguchi et al., 2005). Todo ello indica que ambos genes tienen una función redundante, aunque *FT* parece dominante sobre *TSF*. Su expresión espacial tampoco es completamente solapante, ya que *TSF* se expresa en el tejido vascular del hipocotilo y en los pecíolos, en la parte basal de los cotiledones y en el SAM en plántulas jóvenes; posteriormente en el desarrollo, su patrón de expresión es más similar (Yamaguchi et al., 2005). Tampoco se ha comprobado si forma parte de la señal móvil inductora de la floración.

La creación de todas las combinaciones posibles de mutantes de los genes de la familia de *FT* (*FT*, *TSF*, *MOTHER OF FT –MFT-*, *BROTHER OF FT –BFT-*, *ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOGUE –ATC-* y *TERMINAL FLOWER 1 – TFL1-*) ha permitido estudiar su respuesta a cambios en la temperatura ambiental (Kim et al., 2013). En condiciones de LD a 16°C, los resultados de tiempo de floración indican que son *FT*, *TSF* y *TFL1* los que juegan un papel principal en las respuestas a una reducción de la temperatura (Kim et al., 2013; Strasser et al., 2009). Pero en el caso de *TFL1*, éste tiene un efecto antagonista al de *FT* al ser un represor de la floración (Kobayashi et al., 1999).

### **2.1.2 Represores florales a 16°C: SVP**

Se han descrito múltiples represores que actúan en respuesta a las bajas temperaturas (16°C), entre ellos los factores de transcripción MADS-box SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP), FLOWERING LOCUS C (FLC) y FLOWERING LOCUS M (FLM); la ubiquitina ligasa E3

HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES (HOS1); EARLY FLOWERING 3 (ELF3); o el miRNA miR156 (Balasubramanian et al., 2006; Edwards et al., 2006; J. H. Lee et al., 2007, 2012; Strasser et al., 2009).

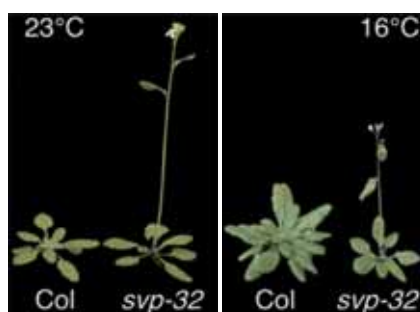
En esta tesis nos centraremos en el estudio de la relación entre TEM y SVP, por lo que a continuación describimos ampliamente su función como regulador de la floración.

SVP es un conocido represor de la floración que actúa en respuesta a bajas temperaturas moderadas y que pertenece a la familia de factores de transcripción MADS-box. Uno de los primeros estudios de la función represora de SVP a bajas temperaturas identificaba a *FT* como uno sus genes diana (Lee et al., 2007); posteriormente se ha comprobado que también regula de manera directa a *SOC1* (Lee et al., 2008) y *TSF* (Jang et al., 2009) a través de la unión a los sitios tipo CArG (Lee et al., 2007). La expresión de todos estos genes está incrementada en los mutantes *svp*, lo que provoca un adelanto de la floración tanto en condiciones de LD como de SD (Jang et al., 2009). Durante la fase vegetativa, la expresión de *SVP* se concentra en las hojas y en el meristemo apical; una vez tiene lugar la floración, su expresión incrementa en el primordio floral (Hartmann et al., 2000). Este patrón de expresión sugiere que desempeña funciones antes y después de la floración. En cuanto a sus genes diana, *SVP* reprime la transcripción de *SOC1* en el meristemo apical del tallo, de manera independiente de *FT* o *TSF*, mientras que regula la expresión de estos últimos en la hoja (Jang et al., 2009; Li et al., 2008).

*SVP* está regulado transcripcionalmente por la acción de las giberelinas y por los genes de la vía autónoma *FCA/FVE*, que reprimen su expresión (Blázquez et al., 2003; Lee et al., 2007); sin embargo no está afectado en mutantes de la vía del fotoperiodo ni por tratamientos de vernalización (Li et al., 2008). Su expresión en plantas silvestres cultivadas a 23°C o 16°C es prácticamente igual (Lee et al., 2007). A nivel de proteína, SVP está regulado por varios elementos del reloj circadiano como LHY y CCA1 (Fujiwara et al., 2008), posiblemente a través de la interacción con ELF3 (Yoshida et al., 2009). Además, se ha descrito su interacción con FLC, otro importante represor de la familia MADS-box, el cual está implicado en la regulación de la floración vía la integración de la ruta de la vernalización y la ruta autónoma (mediante regulación negativa de *FCA/FVE*) (Michaels & Amasino, 1999). Al estudiar la relación entre SVP y FLC en condiciones de bajas temperaturas ambientales de 16°C, se observó que FLC podría requerir a SVP para reprimir la floración (Lee et al., 2007), formando un complejo represor al interactuar *in vivo* durante las fases iniciales del desarrollo vegetativo (Fujiwara et al., 2008; Li et al., 2008).

Los mutantes *svp* muestran el mismo fenotipo de floración temprana a 22°C y a 16°C, produciendo un número de hojas prácticamente idéntico (Fig. 32), lo que confirma la insensibilidad de estos mutantes a los cambios de temperatura, y la función de SVP como represor a ambas temperaturas. Esto sugiere, también, que su efecto represor es más importante a 16°C que a 22°C, ya que la diferencia entre el tiempo de floración del tipo silvestre y de *svp* es mucho mayor a 16°C que a 22°C (Lee et al., 2007).





**Figura 32. Fenotipo de floración temprana de los mutantes *svp* a 16°C y 23°C**

El cultivo de plantas silvestres (Col-0) y mutantes *svp* en condiciones de LD a 16°C y 23°C muestra que las plantas mutante son insensibles a los cambios de temperatura floreciendo tempranamente en ambas condiciones ambientales y con un número casi idéntico de hojas. Extraído de Lee et al., 2007.

Finalmente, también muy recientemente se ha descrito la interacción entre SVP y los genes *TEM1* y *TEM2* en condiciones de LD a 22°C (Tao et al., 2012). Por su importancia para nuestro trabajo, vamos a detallar los resultados obtenidos en el trabajo de Tao y colaboradores. Mediante ensayos de CHIP-chip y análisis de las secuencias enriquecidas se identificaron nuevas secuencias de unión específicas tanto para SVP como para SOC1 (ambos son factores de transcripción MADS-box), identificándose a genes con dominio AP2 como genes diana comunes para ambos. Los genes *TEM*, como ya se ha explicado anteriormente, tienen un dominio AP2 y un dominio B3, y resultaron ser dianas de SVP y de SOC1. Los resultados muestran que SOC1 se une preferentemente a *TEM1* y *RAV1*, mientras SVP lo hace a *TEM1* y *TEM2*. Los análisis de expresión cuantitativa durante el periodo inicial del desarrollo (días 7 a 11) confirmaron que en las plantas *svp-41*, *TEM1* y *TEM2* muestran niveles reducidos de expresión, mientras que en plantas *35S::SVP*, sus niveles son más altos. Analizando en detalle los valores relativos de *TEM1* y *TEM2* en las plantas *svp-41* y *35S::SVP*, los datos mostrados parecen indicar que el mayor cambio se produce en *TEM2*. Los mismos experimentos realizados en plantas deficientes o sobre-expresantes para SOC1 muestran los resultados inversos, con un cambio más significativo también para *TEM2*.

## **2.2 Regulación de la floración por altas temperaturas en condiciones desfavorables de fotoperiodo (SD y 27°C)**

El segundo tipo de respuesta a los cambios de temperatura ambiental se ha descrito para temperaturas moderadamente altas (27°C) combinadas con un fotoperiodo no inductivo (SD). Las altas temperaturas parecen compensar las condiciones desfavorables de fotoperiodo y actúan como una fuerte señal en el desarrollo. En relación con la inducción floral, se ha comprobado que un ligero incremento de 3-5°C provoca una potente inducción de la floración en ausencia de condiciones fotoperiódicas favorables (Fig. 33) (revisado recientemente en Wigge, 2013).



**Figura 33. Las altas temperaturas inducen la floración**

Fenotipo de floración de plantas silvestres cultivadas en condiciones de SD a 23°C (izquierda) o 27°C (derecha). Extraído de Balasubramanian et al., 2006.

En estas condiciones de SD y 27°C, la floración se promueve a través de la activación de *FT* por una vía independiente de CO (Balasubramanian et al., 2006), en la que, según estudios recientes, *PIF4* parece ser el principal inductor (Kumar et al., 2012).

La inducción térmica de *FT* que se produce en SD al aumentar de 23°C a 27°C es un incremento de 10 veces. El mutante nulo *ft-10* muestra una completa insensibilidad a estos cambios de temperatura, lo que indica que la inducción floral temprana a altas temperaturas está mediada por *FT* aún en condiciones desfavorables de fotoperiodo.

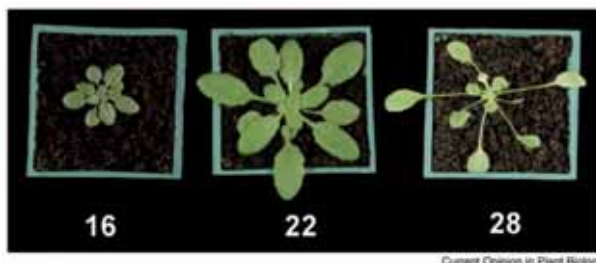
Uno de los represores relacionados con las respuestas a altas temperaturas es *FLM*, cercano en términos de secuencia a *FLC* y que funciona independientemente de las vías autónoma y de la vernalización, pero que interactúa con la ruta del fotoperiodo (Scortecci et al., 2003) y con el gen de la familia AP2, *SMZ*, el cual parece requerir a *FLM* para reprimir a *FT* (Mathieu et al., 2009). En condiciones de alta temperatura, ésta parece ser responsable de suprimir su efecto represor, modulando su actividad y promoviendo una floración temprana (Balasubramanian et al., 2006).

### 3. INTEGRACIÓN DE LAS RUTAS DE LUZ y TEMPERATURA

La arquitectura de las plantas se encuentra afectada por la luz y por la temperatura. Por un lado, la calidad de la luz que incide sobre la superficie de las plantas determina respuestas fotomorfogénicas relacionadas con la elongación del hipocotilo, la expansión de los cotiledones, la extensión de los pecíolos, la reducción de la expansión de la lámina foliar o el momento en que se inicia la floración (revisado en Casal, 2012). Por otra parte, las plantas cultivadas en las mismas condiciones de lumínicas, pero a distintas temperaturas, presentan diferentes cambios morfológicos, como la reducción y compactación en el tamaño de la roseta, cuando se cultivan a 16°C, frente al fenotipo típico de plantas cultivadas en ambientes con sombra cuando se cultivan a altas temperaturas de 27°C/28°C: pecíolos alargados y un área foliar reducida, además de tener alterado el tiempo de floración respecto a las plantas silvestres cultivadas en condiciones estándar de 22°C (Fig. 34) (revisado en Franklin, 2009).

Aunque hemos presentado ambas rutas de forma separada, la importancia de la integración de ambas señales es esencial para el desarrollo de las plantas. Las rutas del control de la floración no son independientes, al contrario, son redes donde los diferentes nodos (los genes) interactúan y son modulados según una multitud de estímulos, tanto ambientales como endógenos. Cada vez más

se tiene en cuenta la interacción entre las diferentes rutas de señalización y su efecto a nivel molecular, para estudiar procesos como la germinación, la arquitectura de la planta, la tolerancia al frío y, cómo no, la floración (Franklin, 2009).



**Figura 34. La arquitectura de las plantas está modula por la temperatura ambiental**

Plantas silvestres cultivadas bajo el mismo fotoperiodo pero a distintas temperaturas muestran rasgos morfológicos muy diferenciados entre los que podemos destacar el tamaño y arquitectura de la roseta y el momento en que se induce la floración. Extraído de la revisión de Franklin, 2009.

La plasticidad de las plantas para adaptarse a ambientes cambiantes requiere una integración de los múltiples estímulos ambientales, entre los cuales la luz y la temperatura son dos de los más importantes. En *Arabidopsis*, la regulación del tiempo de floración por la interacción de las señales lumínicas (fotoperiodo y calidad de luz) y térmicas permite a las plantas tener un mayor conocimiento del entorno y adaptar su respuesta reproductiva.

**3.1 phyB y bajas temperaturas**

La integración de las señales de luz y temperatura en el control de la floración se demostró por primera vez al estudiar el fenotipo de tiempo de floración de distintos mutantes de fitocromos y criptocromos a 22/23°C y 16°C (Blázquez et al., 2003; Halliday et al., 2003). Se observó que la disminución de la temperatura hasta los 16°C suprime completamente el fenotipo de floración temprana de las plantas deficientes en fitocromo B, *phyB* (Fig. 35).



**Figura 35. La baja temperatura ambiental suprime el efecto de floración temprana de los mutantes phyB**

Pérdida del fenotipo de floración temprana de plantas *phyB* mutantes cultivadas en condiciones de SD a 16°C. Extraído de la revisión de (Heggie & Halliday, 2005).

Sin embargo, la respuesta de floración temprana de plantas silvestres cultivadas en condiciones de R<FR a 16°C seguía manteniéndose, lo que indica que otros fitocromos juegan un papel

importante en la represión de la floración a bajas temperaturas. Se considera que phyB tiene un rol menor como represor de la floración a bajas temperaturas, ya que su acción represora es dependiente de la temperatura y está compensada por otros fitocromos, como phyD y phyE, con los cuales establece una interacción sinérgica. Por tanto, la función represora de phyB en el control de la floración es dependiente de la temperatura, lo que indica que la temperatura afecta a las respuestas a la luz (Halliday et al., 2003; Halliday & Whitelam, 2003). Se sabe además que esta ruta de control de la floración de "sensibilidad térmica" es independiente de *FLC* y de *CO*, represor y activador de *FT*, respectivamente (Halliday et al., 2003).

### **3.2 PIF4 y altas temperaturas**

PIF4 fue inicialmente descrito como regulador negativo de la inhibición de la elongación del hipocotilo por phyB (Huq & Quail, 2002), y muy recientemente se ha descubierto su papel como activador directo de *FT* a causa de la inducción térmica (Kumar et al., 2012). Además, PIF4 parece actuar como un importante regulador de los cambios morfológicos inducidos por las altas temperaturas que, además de adelantar la floración, también afectan a diversos aspectos de la arquitectura de la planta, produciendo fenotipos similares a los de las plantas que crecen en condiciones de sombra. Así, el mutante *pif4*, pero no los mutantes *pif1*, *pif3* o *pif5*, pierde el alargamiento del hipocotilo y la hiponastia de las hojas que presentan las plantas silvestres cuando se transfieren de 22°C a 28°C (Koini et al., 2009).

El tiempo de floración de las plantas *pif4-101* cultivadas en condiciones de fotoperiodo desfavorable a 27°C es prácticamente el mismo que a 22°C, es decir en ambas temperaturas muestran un evidente retraso de la floración, produciendo prácticamente el mismo número de hojas. En cambio, en plantas silvestres Col-0 cultivadas a 27°C hay un evidente adelanto de la floración que se correlaciona con un alto nivel de expresión de *FT*. La regulación de *FT* vía PIF4 se produce a través de la unión directa de la proteína al promotor de *FT* en condiciones de SD a 27°C, pero no a 22°C. Al analizar la expresión de *PIF4* en un rango creciente de temperaturas (12°C a 27°C) se observó que aumenta gradualmente con el incremento de temperatura y es a 27°C cuando alcanza su máxima expresión y cuando se une al inductor floral *FT* (Kumar et al., 2012). La unión de PIF4 a *FT* parece estar modulada por la temperatura a través de la acción de los nucleosomas H2A.Z que, a su vez, se une al promotor de *FT* en los mismos sitios que PIF4, por lo que es la temperatura la que determina que se una uno u otro factor; PIF4 lo hace a altas temperaturas, cuando su expresión es mayor, y H2A.Z ocupa su sitio en el promotor mayoritariamente en condiciones de baja temperatura (17°C) (Kumar et al., 2012).

## OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es profundizar en el estudio de la función y regulación de los genes *TEMPRANILLO* por dos de los factores ambientales más importantes para el control de la floración: la luz y la temperatura. Analizaremos el efecto sobre *TEM* de algunos de los componentes más importantes que actúan en la regulación de cada una de estas rutas y estudiaremos la regulación integrada de *TEM* en diferentes condiciones de luz y temperatura.

Los objetivos específicos que nos hemos propuesto alcanzar se enumeran a continuación:

- \* Caracterización de la regulación mediada por la LUZ. Nos proponemos:
  1. Caracterizar la posible regulación de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* por los fitocromos, centrada en el efecto de phyB, mediante:
    - a. Análisis de la expresión temporal de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas deficientes en phyB.
    - b. Análisis del patrón de expresión espacial de *TEM1* en plantas *phyB*.
    - c. Análisis genético de la relación entre TEM y phyB
  2. Identificación de los posibles genes reguladores directos que actúan en la ruta de regulación de phyB, mediante:
    - a. Análisis de la expresión *in silico* de los promotores de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1*
    - b. Ensayo de híbrido sencillo en levaduras
- \* Caracterización del efecto de los cambios moderados de la TEMPERATURA. Nos proponemos:
  - ❖ Caracterizar la posible regulación de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* por cambios en la temperatura ambiental en condiciones de LD a 16°C y 22°C, mediante:
    - a. Análisis de la expresión temporal de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas cultivadas en las condiciones experimentales mencionadas
    - b. Caracterización de la interacción de *TEM1* y *TEM2* con el represor *SVP* a bajas temperaturas ambientales mediante análisis de expresión y cruzamientos entre los mutantes *svp*, *tem1* y *tem2*.
  - ❖ Caracterizar la posible regulación de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* por cambios en la temperatura ambiental en condiciones de SD a 27°C y 22°C, mediante:
    - a. Análisis de la expresión temporal de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas cultivadas en las condiciones experimentales mencionadas
    - b. Análisis de la expresión espacial de *TEM1* en plantas *pTEM1::GUS* en altas temperaturas.
- \* Estudio de la implicación de *TEM* en el control de la floración, por medio de la integración de las rutas de LUZ y TEMPERATURA, mediante el análisis de plantas *phyB* mutantes cultivadas a 16°C o 27°C.

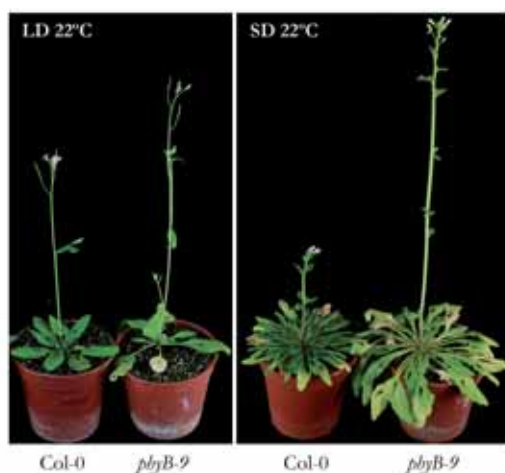
## RESULTADOS

### I. EFECTO DE LA REGULACIÓN POR LA LUZ

Basándonos en la extensa literatura que relaciona la acción de *phyB* con la regulación de la floración por efecto en la expresión de *FT* (revisado en Franklin & Quail, 2010; Matsoukas et al., 2012), decidimos analizar la implicación de los genes *TEM* en esa regulación. Para establecer el efecto de la luz en los genes *TEM* y determinar si estos afectan a la regulación de la floración por la luz procedimos a realizar una serie de experimentos de análisis fenotípico, genético y de expresión en condiciones de LD y SD a 22°C.

#### 1. PAPEL DE LOS FITOCROMOS EN LA REGULACIÓN DE *TEM/RAV*

Las plantas deficientes en fitocromo *phyB* (*phyB*) presentan un fenotipo similar al de las plantas que crecen en condiciones de sombra: hipocotilo y pecíolos alargados, menor cantidad de pigmentos (clorofila), limbo foliar más estrecho, dominancia apical más pronunciada y un adelanto de la floración respecto a las plantas silvestres cultivadas en las mismas condiciones (revisado en Franklin & Quail, 2010) (Fig. 36).

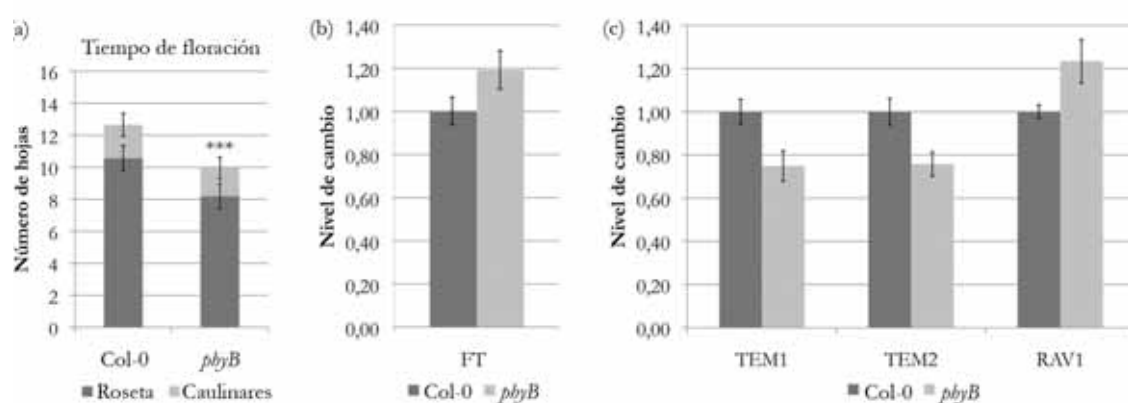


**Figura 36. Fenotipo del mutante *phyB-9* en condiciones de LD y SD a 22°C**

Plantas silvestres y deficientes en *phyB* en condiciones de LD (panel izquierdo) y SD (panel derecho). *phyB* actúa retrasando la floración, por lo que los mutantes *phyB* florecen temprano en ambas condiciones, aunque lo hacen con un mayor número de hojas en SD que en LD.

En condiciones de cultivo estándar de laboratorio, luz blanca y LD o SD a 22°C, los mutantes *phyB* producen menos hojas de roseta que las plantas silvestres Col-0 antes de florecer, en ambos fotoperíodos (Fig. 37a y 38a). Como ya se ha descrito en la introducción, este adelanto en la floración está relacionado con unos niveles de mRNA de *FT* más altos en las plantas *phyB* (Halliday et al., 2003).

Sabiendo que los genes *TEM* son represores directos de *FT* (Castillejo & Pelaz, 2008) quisimos ver si el incremento en la expresión de *FT* y el consiguiente adelanto de la floración en las plantas *phyB* estaban relacionados con cambios en los niveles de mRNA de *TEM*. Inicialmente realizamos experimentos de cuantificación de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en condiciones de LD a 22°C, en plantas silvestres y mutantes *phyB* de 9 días (Fig. 37); elegimos un momento inicial del desarrollo porque es cuando los *TEM* presentan una mayor expresión, como hemos visto en el capítulo anterior. Los resultados obtenidos nos indican que existe una ligera reducción en los niveles de mRNA de los represores *TEM1* y *TEM2* (Fig. 37c), de una magnitud similar al incremento de *FT* (Fig. 37b). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con *TEM*, parece que *RAV1* incrementa sus niveles en plantas *phyB*.

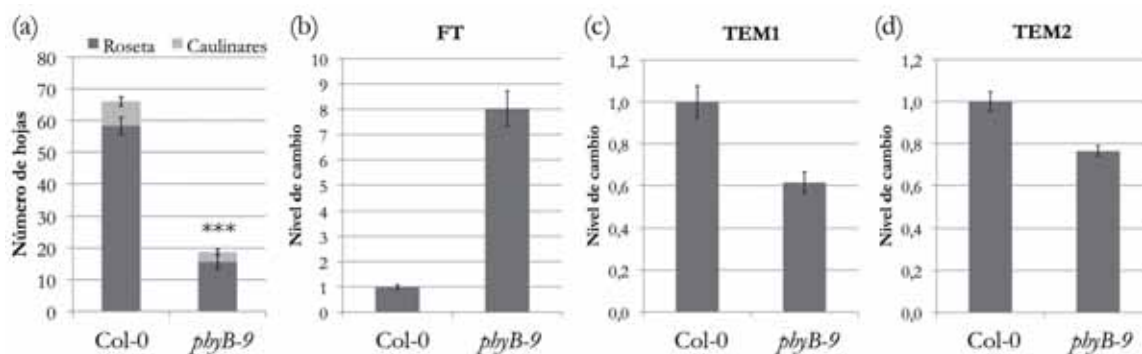


**Figura 37. Tiempo de floración y niveles de mRNA de *FT* y *TEM/RAV1* en plantas mutantes *phyB* en LD**

(a) Tiempo de floración de plantas silvestres Col-0 y mutantes *phyB-9* en LD a 22°C. (b-c) Análisis de los niveles de mRNA de (b) *FT* y (c) *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas Col-0 y *phyB-9* de 9 días, recogidas a ZT18 y cultivadas en placas de MS1%. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. El gen de referencia utilizado es la Ubiquitina 10. Las barras de error en (a) representan la desviación estándar de dos muestras biológicas independientes. Las barras de error en (b-c) representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Los asteriscos muestran la significación estadística ( $p > 0,05$ ) de la diferencia entre *phyB-9* y las plantas silvestres (Col-0) (Test *t*-Student \*\*\* $p < 0,001$ ).

Debido a que la diferencia en el tiempo de floración entre plantas silvestres y plantas deficientes en *phyB* es más acusada en SD que en LD, decidimos repetir la misma cuantificación, tanto del tiempo de floración como de la expresión de *FT* y *TEM* en condiciones de fotoperiodo no inductivo (SD) para comprobar si el efecto de *phyB* en *TEM* también se incrementaba en estas condiciones. Igual que en el caso anterior, nos interesaba cuantificar la expresión de *TEM* en un momento del desarrollo en que muestran una expresión alta, por ello, utilizamos plantas cultivadas durante 2 semanas en SD a 22°C (Fig. 38). Los resultados del tiempo de floración nos indican, como ya esperábamos, que las plantas *phyB* florecen con una gran diferencia respecto a Col-0 en condiciones de SD, y que este adelanto es debido a la activación del inductor *FT*. En relación con los *TEM*, podemos observar que *TEM1* muestra un reducción más pronunciada en su nivel de mRNA que *TEM2* (Fig. 38c,d). Además, si comparamos los niveles en SD con los obtenidos

anteriormente en LD, podemos ver que la falta de *phyB* tiene un efecto mayor en *TEM1* en SD que en LD y prácticamente el mismo en *TEM2*.



**Figura 38. Tiempo de floración y niveles de mRNA de *FT* y *TEM/RAV1* en plantas mutantes *phyB* en SD**

(a) Tiempo de floración de plantas silvestres Col-0 y mutantes *phyB-9* en SD a 22°C. (b-d) Análisis de los niveles de mRNA de (b) *FT*, (c) *TEM1* y (d) *TEM2* en plantas Col-0 y *phyB-9* de 2 semanas, recogidas a ZT12 y cultivadas en placas de MS1%. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. El gen de referencia utilizado es la Ubiquitina 10. Las barras de error en (a) representan la desviación estándar de dos muestras biológicas independientes. Las barras de error en (b-d) representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Los asteriscos muestran la significación estadística ( $p > 0,05$ ) de la diferencia entre *phyB-9* y las plantas silvestres (Col-0) (Test *t*-Student \*\*\* $p < 0,001$ ).

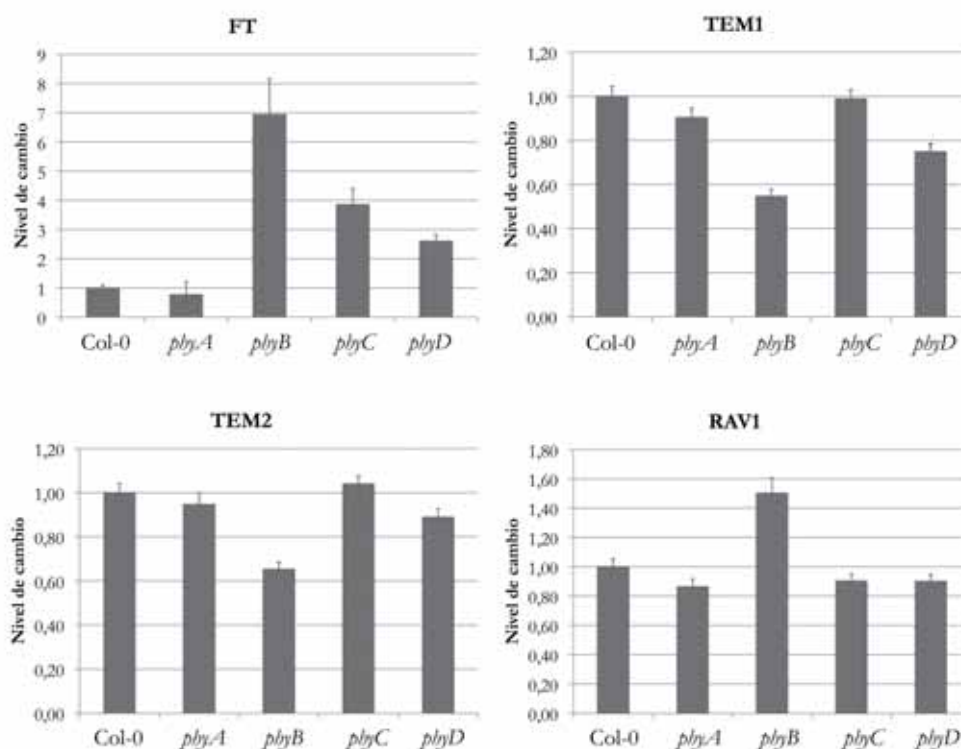
Estos datos sugieren que *phyB* podría ser un activador de *TEM*, y que la reducción en los niveles de *TEM1* y *TEM2* en las plantas mutantes *phyB* podría promover la des-represión de *FT* y, por tanto, contribuir al adelanto de la floración. Además, parece que esta regulación se produce en ambos fotoperíodos, aunque parece mayor en SD, al menos en el caso de *TEM1*.

Ya que el efecto detectado es más evidente en SD, la mayoría de los experimentos que mostraremos en los siguientes apartados se han realizado en estas condiciones experimentales.

### 1.1 Efecto de otros fitocromos y de la sombra simulada en *TEM* y *RAV1*

Seguidamente comprobamos si la regulación positiva de *phyB* sobre *TEM* también se da en el resto de fitocromos. Sabiendo que existe redundancia entre *phyB*, *phyD*, *phyE* y también *phyC* en SD (Franklin et al., 2003; Monte et al., 2003), analizamos la expresión de *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas mutantes para estos fitocromos (*phyB*, *phyD* y *phyC*), y también en mutantes *phyA*, aunque su participación en la regulación de la floración sólo está descrita en condiciones de LD (Mockler et al., 2003; Monte et al., 2003). Al no disponer de semillas de plantas *phyE* no pudimos testar su implicación. Estos análisis se realizaron con plantas cultivadas durante dos semanas en condiciones de SD a 22°C (Fig. 39).





**Figura 39. Niveles de mRNA de *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en mutantes de distintos fitocromos en SD**

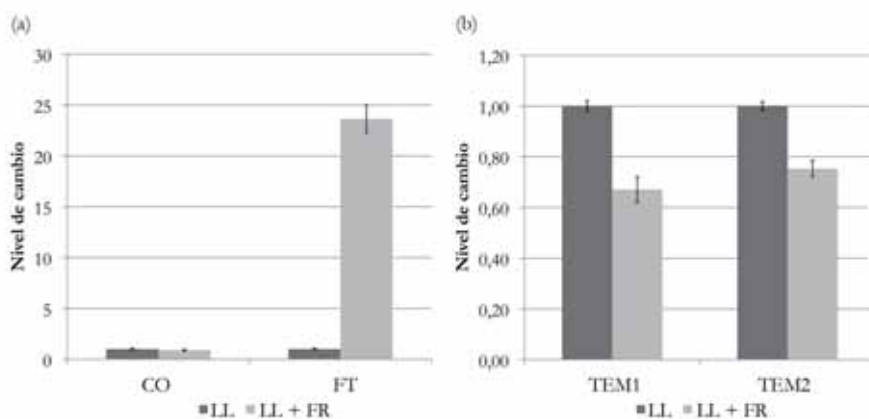
Análisis de los niveles de mRNA de *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres Col-0 y mutantes *phyA-211*, *phyB-9*, *phyC-2* y *phyD-SD1-4* en SD a 22°C cultivadas durante 2 semanas en placas de MS1% y recogidas a ZT12. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. El gen de referencia utilizado es la Ubiquitina 10. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

Los resultados obtenidos nos indican que *phyA* no tiene un papel destacable en la regulación de los niveles de *FT* en estas condiciones, al mostrar las plantas *phyA* unos valores similares a los de las plantas silvestres Col-0. En cambio, en los mutantes *phyB*, *phyC* y *phyD* sí se observa un cambio evidente en los niveles de *FT*, que aumentan en comparación con el nivel de las plantas silvestres, lo que indica que estos tres fitocromos son redundantes en el control de la floración a través de la regulación de *FT* (Monte et al., 2003). Al analizar la expresión de nuestros genes de interés en las mismas plantas, confirmamos la reducción de los niveles de *TEM1* en las plantas *phyB*, de alrededor de un 40-45% respecto al tipo silvestre, y de *TEM2*, de alrededor de un 30-35%. Además, igual que ocurre en condiciones de LD, *RAV1* está regulado positivamente en las plantas *phyB*. En el resto de mutantes, con excepción de *phyD*, no se observan cambios evidentes de expresión, por lo que parece que estos fitocromos no actúan de manera redundante sobre la expresión de *TEM/RAV1* en SD. En el caso de *phyD*, existe una ligera reducción de *TEM1* pero no se observan cambios significativos ni en *TEM2* ni en *RAV1*.

Ya que el efecto más importante en los genes *TEM/RAV1* es el del fitocromo *phyB*, en condiciones de SD, decidimos continuar nuestros estudios con este mutante.

En paralelo, decidimos explorar una condición experimental, denominada sombra simulada, en la cual se reproduce el efecto de déficit de *phyB* en las plantas silvestres. Como se ha comentado en la introducción, cuando el ratio entre la luz roja y la luz roja lejana está desplazado hacia esta última ( $R < FR$ ), el equilibrio entre la forma activa e inactiva de *phyB* se desplaza hacia la forma inactiva, mientras que el de *phyA* lo hace hacia la activa. Es decir, la luz roja lejana promueve la inactivación de *phyB* y promueve las respuestas dependientes de *phyA* (revisado en Casal, 2012).

Nos planteamos si el efecto sobre *TEM/RAV* en estas condiciones de "déficit natural" de *phyB* podría ser el mismo que el observado en las plantas mutantes *phyB*. Para ello, realizamos un primer experimento en luz blanca y luz blanca suplementada con FR y analizamos la expresión de *CO*, *FT*, *TEM1* y *TEM2* en plantas silvestres Col-0. Todas las semillas fueron cultivadas durante 2 días en condiciones de luz blanca continua (LL) para facilitar su germinación; pasado ese tiempo, una parte se transfirió a LL suplementada con luz FR (LL+FR), y el resto se dejó como control en LL. Los dos grupos estuvieron en estas condiciones durante 7 días más. Finalmente, las muestras se recogieron cuando las plantas tenían 9 días. Los resultados obtenidos en estas condiciones (Fig. 40) nos confirman que *FT* está claramente activado, de manera independiente de la regulación transcripcional de *CO*, en luz suplementada con FR, mientras que *TEM1* y *TEM2* reducen sus niveles de mRNA en una proporción muy similar a la observada en condiciones de SD en plantas *phyB*, con un mayor efecto en la expresión de *TEM1*. Por tanto, *TEM1* y *TEM2* también responden a condiciones de sombra simulada.



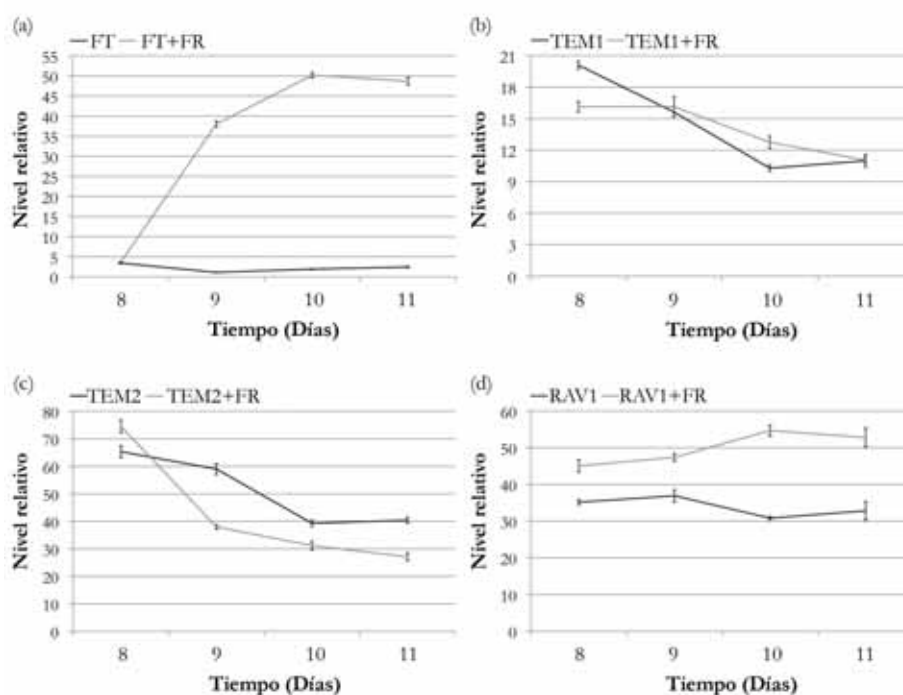
**Figura 40. Niveles de mRNA de *CO*, *FT*, *TEM1* y *TEM2* en sombra simulada**

Análisis de los niveles de mRNA de (a) *CO*, *FT* y (b) *TEM1*, *TEM2* en plantas silvestres Col-0 en condiciones de luz continua (LL) o luz continua enriquecida con FR (LL+FR), cultivadas en placa con MS1% durante 9 días. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. El gen de referencia utilizado es la Ubiquitina 10. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

Cultivando las plantas menos días en LL, con un entrenamiento previo en LD para evitar perder el efecto regulador del reloj circadiano (que se mantiene aproximadamente unos 3 días), obtuvimos resultados similares. En este experimento, las plántulas germinaron y crecieron en LD a 22°C durante 6 días. Al inicio del día 7, todas las plantas se pasaron a LL durante 24h de manera

que todas se sincronizaran en un fotoperiodo de luz continua. El día 8, a ZT18, las plantas control se mantuvieron en condiciones de LL y el resto pasaron a LL+ FR, donde se cultivaron durante 3 días más (días 9 a 11). El día 8, a ZT19 (ZT18 + 1 hora), se estableció el punto inicial de recogida de las muestras. De manera que las plantas tratadas con el suplemento de FR se recogieron 1 hora después que las plantas control (lo que equivale a un tratamiento de 1 hora de FR). Por tanto, el punto del día 8 muestra los resultados del tratamiento de 1 h de FR. El resto de días, todas las muestras (LL y LL+FR) se recogieron en el punto ZT18 (calculado a partir de los días iniciales de crecimiento en LD), de manera que coincidiera con el pico de expresión de *TEM1* en condiciones de LD. Por tanto, los datos del día 9 equivalen a un día completo de tratamiento de LL + FR o LL sin FR, y así sucesivamente el resto de días.

Los resultados obtenidos (Fig. 41) indican que *FT* incrementa notablemente su nivel de mRNA a partir del primer día completo de tratamiento de LL+FR (día 9 en adelante), alcanzando su máximo entre los días 10 y 11 de crecimiento. Los niveles del mRNA de *TEM1* muestran un ligero descenso después de 1 hora de tratamiento con FR (día 8), pero no posteriormente. Por otra parte, *TEM2* muestra un ligero incremento de expresión, poco significativo, 1 hora después del tratamiento con FR (día 8), y un marcado descenso en el resto de puntos analizados. Por último, *RAV1* muestra la esperada expresión opuesta, al incrementar su abundancia en todos los puntos analizados en condiciones de LL+FR.



**Figura 41. Niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en sombra simulada a lo largo del desarrollo**

Análisis de los niveles de mRNA de (a) *FT*, (b) *TEM1*, (c) *TEM2* y (d) *RAV1* en plantas silvestres Col-0 en condiciones de luz continua (LL) o luz continua enriquecida con FR (LL+FR), cultivadas en placa con MS1%. Las plántulas germinaron y crecieron en LD durante 6 días y el 7<sup>a</sup> pasaron a luz continua. El día 8 unas placas continuaron en LL y otra pasaron a LL+FR. El punto del día 8 (punto 0) se recogió en

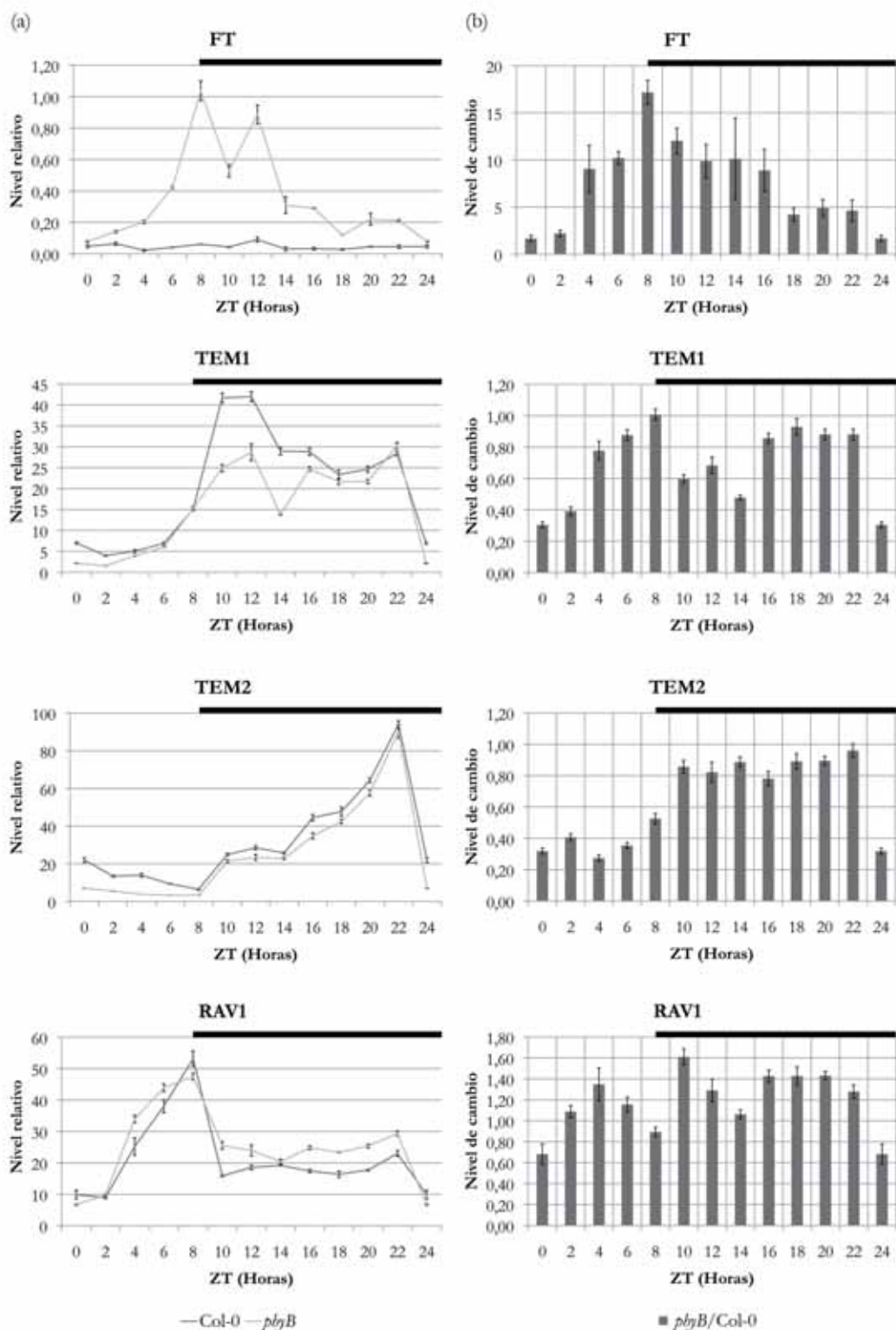
las plantas control (LL) a ZT18 y en las plantas tratadas con FR, 1 hora después del inicio del tratamiento. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. El gen de referencia utilizado es la Ubiquitina 10. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

Conjuntamente, todos estos resultados muestran que en plantas deficientes en *phyB*, en LD o SD, *TEM1* reduce claramente su expresión, lo que indica que *phyB* es un regulador positivo de *TEM1*. Además, la comparación de los cambios de expresión en plantas *phyB* en condiciones de SD y LD sugiere que la acción de *phyB* sobre *TEM1* podría ser más importante en SD. En cambio, el efecto sobre *TEM2* parece ser menor en las plantas *phyB* y mayor en condiciones de sombra simulada, bien por déficit de *phyB* o por activación de las respuestas dependientes de *phyA*. El claro aumento de la expresión de *RAV1*, tanto en plantas deficientes en *phyB* como en el tratamiento de sombra simulada, nos indica que *phyB* sería un represor de la expresión de *RAV1*.

## **1.2 Regulación temporal de los niveles de *TEM/RAV* en plantas deficientes en *phyB***

Para confirmar que los cambios de *TEM/RAV1* observados en los mutantes *phyB* no se deben a un cambio en el pico de expresión de estos genes (ya que las anteriores muestras se habían recogido en el pico de *TEM1* a ZT12 en SD) (Fig. 38 y 39), decidimos realizar experimentos de análisis de la expresión a lo largo de 24 horas. Para ello, cultivamos plantas Col-0 y mutantes *phyB* durante 2 semanas en condiciones de SD a 22°C. Además, decidimos realizar los análisis de cuantificación de los niveles de mRNA en las mismas condiciones en las que analizamos el tiempo de floración de esas plantas, por lo que cultivamos las plantas en sustrato de tierra y no en placa. De esta manera también se elimina cualquier posible efecto de la sacarosa sobre la expresión de estos genes.

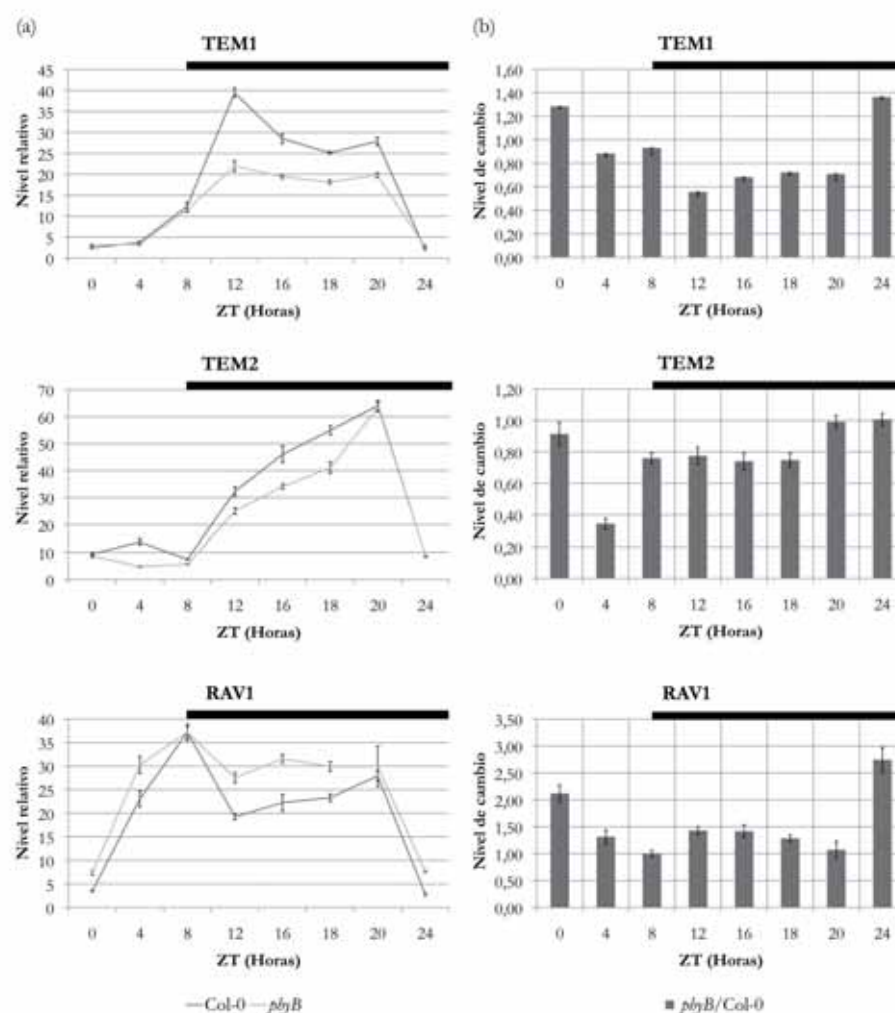
En el primer análisis de expresión realizado decidimos ser exhaustivos y recogimos muestras cada 2 horas (Fig. 42); al comprobar que no perdíamos excesiva información, en el segundo experimento decidimos recoger las muestras cada 4 horas (Fig. 43). Se muestran ambos por separado y se incluye la cuantificación del nivel de cambio observado en las plantas *phyB* para cada uno de los genes estudiados, respecto al valor obtenido en las plantas silvestres Col-0.



**Figura 42. Niveles de mRNA de *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres y mutantes *phyB*, en SD (primer experimento)**

Expresión a lo largo de 24 horas de *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres (gris oscuro) y *phyB-9* (gris claro) cultivadas durante 2 semanas en tierra en SD a 22°C. (a) Niveles de expresión relativa al gen de referencia Ubiquitina 10. (b) Niveles de cambio de los valores de cada gen en plantas *phyB-9* respecto a *Col-0* (cálculo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Las muestras se recogieron cada 2 horas. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

Los datos obtenidos en el primer experimento (Fig. 42) nos confirman el claro aumento de *FT* en las plantas *phyB*, en prácticamente todos los puntos analizados, y la reducción de los niveles de *TEM1* durante las primeras horas del periodo nocturno (ZT10 a ZT14) y las primeras de la mañana (ZT24/ZT0-ZT2), periodo que coincide con la transición oscuridad-luz. Este resultado valida los resultados obtenidos anteriormente y confirma que la reducción de *TEM1* alrededor del pico (a ZT12) es de aproximadamente un 40-50%. En este caso, los valores obtenidos para *TEM2* muestran una reducción mucho más sutil durante el periodo nocturno, que en cambio es más evidente durante todos los puntos diurnos recogidos. Es decir, *TEM2* podría estar regulado por *phyB* únicamente durante las horas de luz. Por último, también podemos confirmar que *RAV1* presenta una regulación opuesta a *TEM1* y *TEM2*, al mostrar unos valores más altos en *phyB* que en las plantas silvestres durante el periodo nocturno.



**Figura 43. Niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres y mutantes *phyB*, en SD (segundo experimento)**

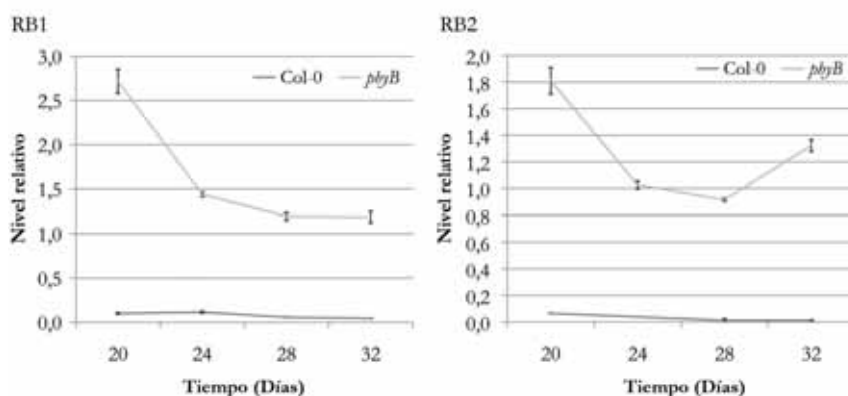
Confirmación de los valores de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* a lo largo de 24 horas en plantas silvestres (gris oscuro) y *phyB-9* (gris claro) cultivadas durante 2 semanas en tierra en SD a 22°C. Las muestras se han recogido cada 4 horas. (a) Niveles de expresión relativa al gen de referencia Ubiquitina 10. (b) Niveles de cambio de los valores de cada gen en plantas *phyB-9* respecto a Col-0 (cálculo del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

El análisis del segundo experimento (Fig. 43) confirma la reducción de los niveles de *TEM1* durante el periodo nocturno, *TEM2* durante la mayoría de puntos analizados, y especialmente durante el periodo diurno aunque es un momento en que su expresión en las plantas silvestres es baja, por lo que no podemos saber si la reducción en las plantas *phyB* es biológicamente significativa. Finalmente, volvemos a observar un incremento de *RAV1*, en todos los puntos analizados.

También es interesante destacar las coincidencias y diferencias en los patrones de expresión de *TEM1/TEM2* y *RAV1* en las plantas silvestres (comparación de los valores de Col-0 entre la Fig. 42 y 43). Los primeros muestran unos niveles de expresión bajos durante las horas de luz con picos nocturnos de mRNA; *TEM1* tiene dos picos de expresión, uno durante las primeras horas de la noche (ZT10-12) y otro a última hora de la noche (ZT20-22) y *TEM2* sólo uno muy claro a última hora del periodo nocturno (ZT22) en estas condiciones de crecimiento; mientras que *RAV1* va incrementando su nivel de mRNA durante el periodo de luz hasta alcanzar su máximo en la transición luz-oscuridad (ZT8), y parece coincidir con *TEM1* y *TEM2* en el pico de última hora de la noche (ZT20-22). Además, los niveles relativos de mRNA de *TEM1* y *RAV1* son bastante similares, mientras que *TEM2* muestra unos niveles más altos.

Para estudiar si el efecto del déficit de *phyB* tiene un efecto a largo plazo en los genes *TEM/RAV* y *FT*, cuantificamos la expresión de estos genes a lo largo del desarrollo. Cultivamos plantas Col-0 y mutantes *phyB* en SD a 22°C durante 32 días y recogimos muestras entre los días 20 y 32, cada 4 días. Este periodo coincide con la caída de los niveles de expresión de *TEM*, tal y como hemos visto en el capítulo anterior.

Los resultados obtenidos en el análisis de los niveles de *FT* (Fig. 44) indican que en las plantas deficientes en *phyB* tienen niveles mucho más altos de *FT* que las plantas silvestres en todos los puntos analizados, y que parecen descender a partir del día 20, cuando probablemente ya se ha producido la inducción.



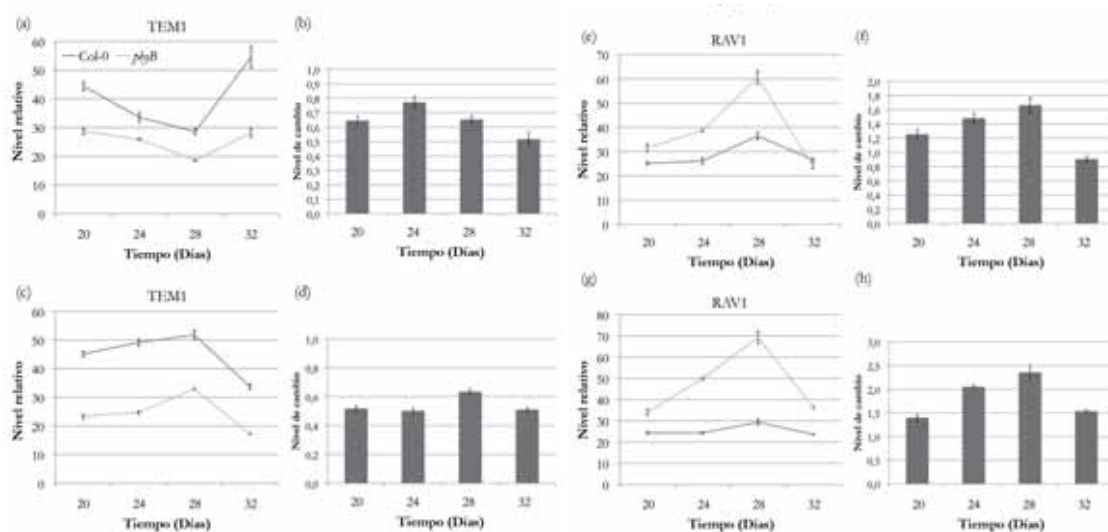
**Figura 44. Análisis de los niveles de mRNA de *FT* a lo largo del desarrollo en plantas silvestres y *phyB*, en SD**

Análisis de los niveles de mRNA de *FT* en plantas silvestres Col-0 y mutantes *phyB-9* cultivadas en tierra, en SD a 22°C. Las muestras se han recogido a la misma hora del día, ZT12. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Se muestran dos experimentos independientes (RB1 y RB2). Las muestras se han

recogido cada 4 días durante los días 20 a 32. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

Al comparar este dato con los valores obtenidos para *TEM1* en las mismas condiciones experimentales (Fig. 45a-d), podemos observar que su expresión en plantas *phyB* parece mantener una disminución del 40-50% bastante constante durante el periodo analizado, mostrando además una tendencia muy similar entre las plantas Col-0 y *phyB*. Sin embargo, los niveles que presentan las plantas *phyB* en prácticamente todos los puntos analizados son menores que el punto mínimo al que llega en las plantas Col-0, alcanzando el mismo valor relativo (o menor) de *TEM1* a día 20 en los mutantes *phyB* que a día 28-32 en las plantas silvestres, lo que podría ser suficiente para permitir la inducción de *FT* en las plantas *phyB*.

Los resultados obtenidos en el análisis de *RAV1* en las plantas *phyB* (Fig. 45e-h) reiteran el aumento de la expresión ya observado en estos mutantes y muestran que el déficit de *phyB* aumenta claramente la expresión de *RAV1* alrededor de las 4 semanas, de manera opuesta a lo que ocurre con los genes *TEM*. Una vez más, este comportamiento opuesto en la expresión de los genes *TEM1/TEM2* y *RAV1* nos sugiere que su función no debe ser redundante en el control de la floración en estas condiciones.



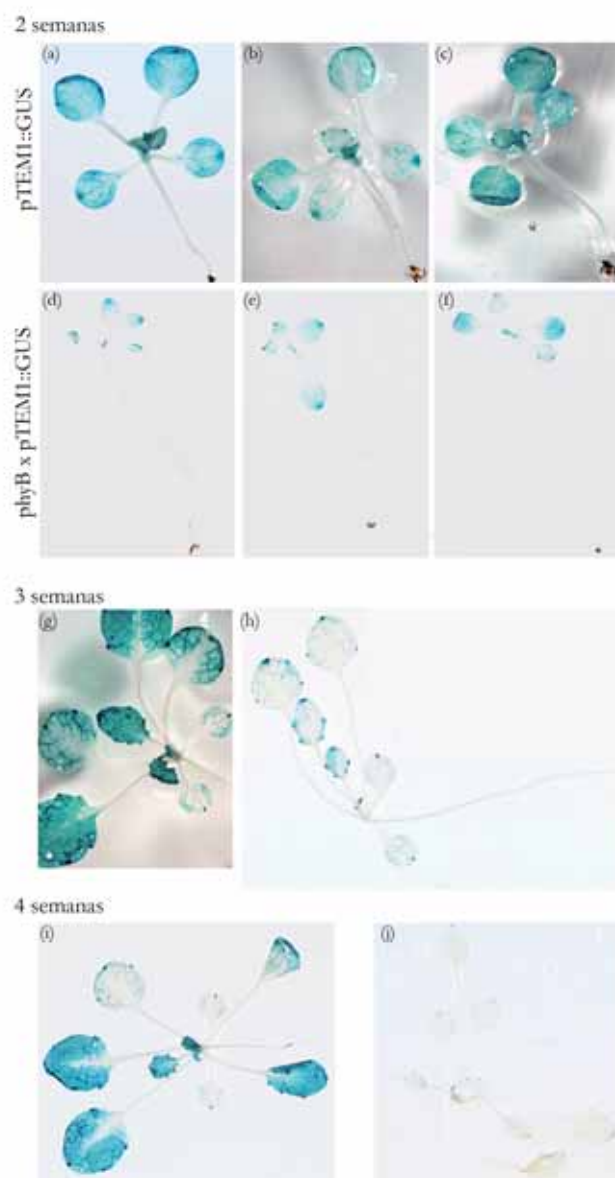
**Figura 45. Niveles de mRNA de *TEM1* y *RAV1* a lo largo del desarrollo en plantas silvestres y *phyB*, en SD**

Análisis de los niveles de mRNA de (a-d) *TEM1* y (e-h) *RAV1* en las mismas plantas silvestres Col-0 (gris oscuro) y mutantes *phyB-9* (gris claro) que en la figura anterior. Las gráficas (a-b, e-f) representan los valores del experimento RB1 y (c-d, g-h), los del RB2. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Los paneles de la izquierda representan el nivel relativo a Ubiquitina 10, y los de la derecha, el nivel de cambio de los valores de *phyB* respecto a Col-0 analizados mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



### 1.3 Regulación espacial de los niveles de *TEM1* en plantas deficientes en *phyB*

Cruzamos las plantas *pTEM1::GUS* con las plantas *phyB* y realizamos ensayos de detección histoquímica de la proteína GUS para determinar si *phyB* afecta al patrón espacial de expresión de *TEM1* a lo largo del desarrollo (Fig. 46). Para comparar estos resultados con los de expresión cuantitativa, recogimos las muestras durante las semanas 2 a 4 en las mismas condiciones que los experimentos anteriormente mostrados. Se muestran 3 réplicas biológicas independientes recogidas después de dos semanas en SD a 22°C para cada uno de los genotipos *pTEM1::GUS* y *phyB pTEM1::GUS* (Fig. 46a-f) Para simplificar la figura, se muestra únicamente una muestra biológica representativa correspondientes a las semanas 3 (Fig. 46g,h) y 4 (Fig. 46i,j).



**Figura 46. Ensayo de tinción histoquímica de GUS en plantas *pTEM1::GUS* y *phyB pTEM1::GUS* a lo largo del desarrollo, en SD**

Las plantas fueron cultivadas en tierra, en condiciones de SD, durante 4 semanas. Las muestras se recogieron en las semanas 2, 3 y 4. Se muestran 3 réplicas biológicas de las plantas recogidas a 2 semanas (a, f) y una muestra representativa de cada genotipo, las semanas 3 (g,h) y 4 (i,j) para simplificar la figura.

Como se puede observar, estos resultados nos confirman la reducción en los niveles de mRNA de *TEM1* obtenidos anteriormente y detallan que *TEM1* parece más reducido a partir de la tercera semana en las plantas *phyB* llegando a prácticamente no detectarse expresión en la cuarta semana. Durante ese periodo, en las plantas *phyB pTEM1::GUS* se reduce drásticamente la expresión en el mesófilo y el tejido vascular (venas secundarias) de las plantas control *pTEM1::GUS*, restringiéndose a la zona de los hidatodos. Esta reducción parece deberse a una regulación transcripcional de *TEM1* en los mutantes *phyB*.

En conjunto, todos estos datos nos indican que *phyB* es un regulador positivo de *TEM1* y parece regular, de manera indirecta, sus niveles de transcripción a lo largo del día y a lo largo del desarrollo, probablemente actuando en el mesófilo.

#### 1.4 Regulación del tiempo de floración por los mutantes *phyB* y *tem*

Para comprobar si el efecto de *phyB* en la floración se debe en parte a la falta de los represores *TEM1* y *TEM2*, decidimos cruzar mutantes *phyB* con el doble mutante *tem1 tem2*, obteniendo las combinaciones de mutantes dobles correspondientes, *phyB tem1* y *phyB tem2*, así como el triple mutante *phyB tem1 tem2*. Además, cruzamos plantas *phyB* con las sobre-expresantes de *TEM1*, para obtener plantas *phyB 35S::TEM1*, aunque este último cruce está en fase de selección de semillas en la generación F2. Con los dobles y el triple mutante obtenidos, procedimos a realizar un análisis de los fenotipos de tiempo de floración en LD y SD a 22°C.

Antes de analizar en detalle los datos cuantitativos obtenidos, si nos fijamos en la arquitectura de las plantas podemos ver claramente que las plantas que tienen un fondo *phyB* mutante mantienen características fenotípicas similares al mutante *phyB*, con una clara elongación de pecíolos e hipocotilo (no cuantificada), tanto en condiciones de SD (Fig. 47) como en LD (Fig. 48). En el caso de *phyB tem2* estos rasgos están incluso más acentuados que en el mutante *phyB*, lo que sugiere que la pérdida de *TEM2* acentúa las respuestas a la sombra.



**Figura 47. Fenotipos de floración en plantas de 26 días cultivadas en SD a 22°C**

En relación al tiempo de floración en condiciones de SD (Tabla 12), el triple mutante *phyB tem1 tem2* es el que florece más temprano, al producir entre 5 y 8 hojas de roseta e invertir entre 20 y 24 días en hacerlo, datos que son estadísticamente significativas respecto al resto de genotipos analizados. Seguidamente, florecen las plantas *phyB*, *phyB tem2*, *tem1 tem2* y *phyB tem1*, que producen

un número promedio de hojas totales muy similar, situándose entre las 18 y 25 hojas; todos ellos florecen tempranamente respecto a las plantas silvestres Col-0. Debido a la alta desviación estándar detectada entre las plantas *phyB tem1*, *phyB tem2* y *tem1 tem2* los datos indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre estos genotipos y las plantas *phyB*. La cuantificación del número de días que tardan las plantas en florecer nos indica que este grupo de cuatro genotipos florece entre los 33 y los 44 días, en promedio. Comparados con las plantas silvestres, todas ellas presentan una floración temprana, tanto en el número de hojas producidas como en el número de días que tardan en florecer.

Genotipo	Tiempo de floración				
	Roseta <sup>a</sup> ± SD <sup>e</sup>	Caulinar <sup>b</sup> ± SD	Totales <sup>c</sup> ± SD	Días <sup>d</sup> ± SD	Semanas
<b>Experimento 1</b>					
Col-0	58,2 ± 2,9	7,1 ± 1,6	65,2 ± 3,1	68,5 ± 2,1	9-10
<i>phyB-9</i>	16,0 ± 1,9	3,8 ± 0,6	19,8 ± 1,5	39,6 ± 1,6	5-6
<i>tem1-1tem2-2</i>	19,8 ± 4,6	3,5 ± 0,9	23,3 ± 5,2	36,0 ± 3,0	5-6
<i>phyB-9tem1-1</i>	21,4 ± 3,5	3,7 ± 0,5	25,1 ± 3,5	41,1 ± 3,4	5-6
<i>phyB-9tem2-2</i>	17,8 ± 3,0	4,4 ± 0,5	22,2 ± 3,1	44,4 ± 5,7	6-7
<i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	8,5 ± 1,5	3,1 ± 0,6	11,6 ± 1,7	24,0 ± 0,9	3-4
<b>Experimento 2</b>					
Col-0	58,4 ± 2,5	8,3 ± 0,9	66,7 ± 2,3	67,5 ± 3,1	9-10
<i>phyB-9</i>	15,4 ± 2,4	2,7 ± 0,7	18,1 ± 2,6	37,8 ± 3,4	5-6
<i>tem1-1tem2-2</i>	19,6 ± 6,3	3,2 ± 0,7	22,8 ± 6,4	33,5 ± 4,3	4-5
<i>phyB-9tem2-2</i>	16,8 ± 5,4	2,3 ± 0,9	19,2 ± 6,0	40,4 ± 7,7	5-6
<i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	5,5 ± 1,0	2,4 ± 0,5	7,9 ± 1,2	20,6 ± 2,3	2-3

**Tabla 12. Tiempo de floración de las combinaciones mutantes *phyB*, *tem1* y *tem2*, SD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), número de hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulinar) y número de hojas totales (<sup>c</sup> Totales), además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. Los datos de las plantas *phyB tem1* del segundo experimento no se han tenido en cuenta al estar esas plantas afectadas por estrés durante el crecimiento. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 8 y 19 por genotipo/experimento. Los datos se han analizado mediante análisis de la varianza (ANOVA de 1 vía) y el test para comparaciones múltiples de Bonferroni. Los datos del análisis estadístico están en el anexo (Anexo - Tabla 12).

En conjunto, estos datos del tiempo de floración nos indican que existe un efecto aditivo entre *phyB* y *tem1 tem2*, ya que el triple mutante es claramente más temprano que los mutantes parentales, al reducirse el número de hojas y de días a prácticamente la mitad.

Respecto a los dobles mutantes es difícil concluir si las diferencias entre sus tiempos de floración son biológicamente significativas, ya que estadísticamente no podemos afirmar que existan diferencias entre los datos obtenidos. Lo que sí podemos concluir es que todos ellos florecen con prácticamente la mitad de hojas y en la mitad de días que las plantas silvestres.

Cuando analizamos los fenotipos de todas estas plantas en condiciones de LD (Fig. 48), podemos ver un comportamiento muy similar al observado en SD. Las combinaciones de dobles y triples mutantes con fondo *phyB* presentan un fenotipo típico de respuestas a la sombra, más acusado en las plantas *phyB tem2*.



**Figura 48. Fenotipos de floración en plantas de 20 días cultivadas en LD a 22°C**

Las puntas de flecha señalan las flores formadas en el tallo principal en aquellos fenotipos en los que es difícil diferenciarla.

El análisis del tiempo de floración en LD (Tabla 13) también coincide con los datos obtenidos en SD. El triple mutante *phyB tem1 tem2* florece en primer lugar, con un reducido número de hojas. Seguidamente, florecen *tem1 tem2* y *phyB tem1* con prácticamente el mismo número de hojas y *phyB* y *phyB tem2*, los cuales tampoco presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sí. Todos ellos florecen significativamente más pronto que las plantas silvestres Col-0. Analizando el número de días, el triple *phyB tem1 tem2* es más temprano que el mutante sencillo *phyB*, y que las plantas silvestres; sin embargo no es más temprano que el doble *tem1 tem2*, cuya diferencia no es estadísticamente significativa. Esto sugiere que el adelanto de la floración en el tiempo depende de la ausencia de *TEM1* y *TEM2*.

Genotipo	Tiempo de floración			
	Roseta <sup>a</sup> ± SD <sup>e</sup>	Caulinar <sup>b</sup> ± SD	Totales <sup>c</sup> ± SD	Días <sup>d</sup> ± SD
<b>Experimento 1</b>				
Col-0	10,4 ± 0,5	2,5 ± 0,5	13,1 ± 0,8	19,1 ± 0,8
<i>phyB-9</i>	7,3 ± 1,0	2,2 ± 0,4	9,7 ± 1,2	18,7 ± 0,7
<i>tem1-1tem2-2</i>	5,7 ± 0,5	3,0 ± 0,5	8,8 ± 1,0	12,8 ± 0,4
<i>phyB-9tem1-1</i>	6,3 ± 1,6	2,4 ± 0,5	8,8 ± 1,9	15,0 ± 0,8
<i>phyB-9tem2-2</i>	8,0 ± 1,6	3,0 ± 0,0	11,0 ± 1,6	16,6 ± 1,1
<i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	3,8 ± 0,4	2,1 ± 0,3	6,0 ± 0,4	12,0 ± 0,8
<b>Experimento 2</b>				
Col-0	11,2 ± 1,1	2,7 ± 0,5	13,8 ± 1,3	20,3 ± 1,6
<i>phyB-9</i>	8,3 ± 0,7	2,6 ± 0,5	10,9 ± 1,1	19,3 ± 1,1
<i>tem1-1tem2-2</i>	6,2 ± 0,5	2,6 ± 0,5	8,9 ± 0,6	13,6 ± 0,5
<i>phyB-9tem1-1</i>	5,1 ± 1,0	2,3 ± 0,5	7,4 ± 1,1	15,3 ± 0,6
<i>phyB-9tem2-2</i>	8,1 ± 0,5	2,7 ± 0,5	10,7 ± 0,7	17,7 ± 1,4
<i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	4,5 ± 0,7	2,1 ± 0,5	6,5 ± 0,8	13,1 ± 0,9

**Tabla 13. Tiempo de floración de las combinaciones mutantes *phyB*, *tem1* y *tem2*, LD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), número de hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulinar) y número de hojas totales (<sup>c</sup> Totales), además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 8 y 20 por genotipo/experimento. Los datos se han analizado mediante análisis de la varianza (ANOVA de 1-vía) y el test para comparaciones múltiples de Bonferroni. Los datos del análisis estadístico están en el anexo (Anexo – Tabla 13).

En conjunto, los datos de floración nos indican que *phyB* y *TEM* tienen un efecto parcialmente independiente sobre el control de la floración, actuando también sobre otros genes implicados en el control de la floración.

## **2. REGULADORES EN LA RUTA DE LOS FITOCROMOS: PIFs y VOZ**

Después de comprobar que *TEM1* y *TEM2* están controlados positivamente por *phyB*, o por respuestas dependientes de sombra simulada donde *phyB* y *phyA* son los fitocromos dominantes, y que, por el contrario, *RAV1* está controlado negativamente, nuestra siguiente pregunta se centró en estudiar algunos de los genes que actúan en la ruta de los fitocromos que pudieran controlar su expresión.

La señal lumínica captada por los fitocromos se transduce a través de una serie de factores que activan, reprimen o degradan a las proteínas responsables de promover las respuestas a las diferentes condiciones de luz (cantidad, calidad, intensidad, etc.) u oscuridad.

Entre esos factores nos hemos interesado por dos de ellos, regulados directamente por los fitocromos: los factores de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs) y VASCULAR PLANT ONE- ZINC FINGER (VOZ). La relación de *phyB* con estos componentes se puede resumir brevemente en que ambos están regulados de forma negativa a través de interacciones proteicas con *phyB* en el núcleo (Castillon et al., 2007; Yasui et al., 2012). Recordemos que *phyB* es un regulador negativo de la floración, por lo que regulará negativamente a los factores que actúen como inductores florales, o positivamente a los represores florales, como ya hemos mostrado para *TEM1* y *TEM2*.

Como ya hemos visto, los mutantes *phyB* tienen una floración temprana debido a unos altos niveles de *FT*. Aunque ni los mutantes *pif* sencillos ni el cuádruple *pifQ* parecen presentar fenotipos de floración en condiciones de LD (Shin et al., 2009), la sobre-expresión de PIF5 (*35S::PIF5*) en LD y SD a 22°C (Fujimori et al., 2004), y la de PIF4 (*35S::PIF4*) en condiciones de alta temperatura (27°C) (Kumar et al., 2012) provocan una floración temprana. En el caso de los factores VOZ recientemente se ha descrito su papel como promotores de la floración activando de manera indirecta a *FT* en condiciones de LD (Yasui et al., 2012).

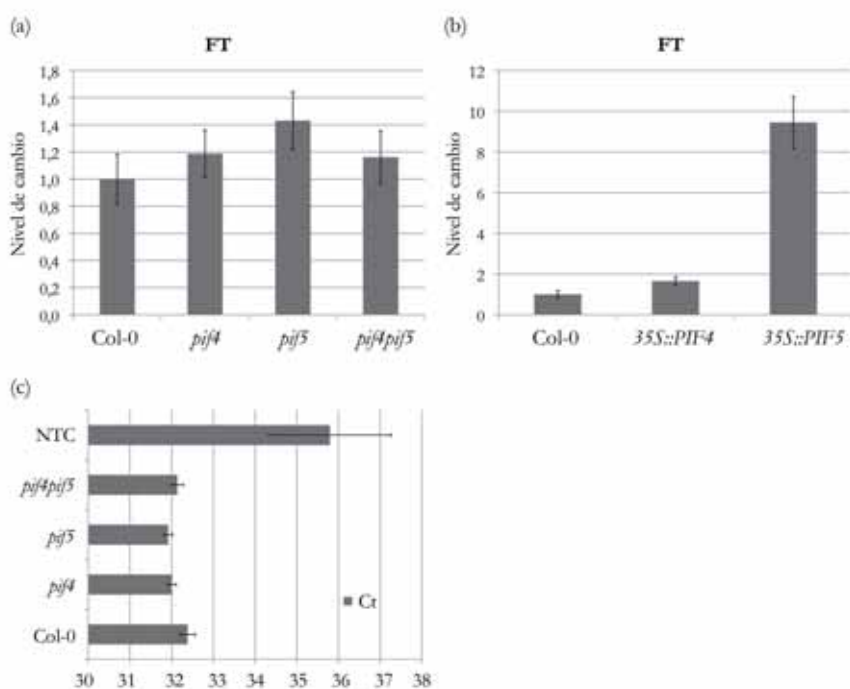
Por todo ello nos propusimos estudiar en detalle la expresión de *FT*, *TEM* y *RAV1* en estos genotipos y analizar sus tiempos de floración en condiciones de LD y SD para comprobar si alguno de estos factores podía actuar como transductor de la información percibida por el fitocromo para controlar la floración a través de la modulación de los niveles de transcripción de los *TEM*.

### **2.1 Phytochrome Interacting Factors (PIF)**

Nos pareció relevante estudiar la posible implicación de los factores PIF en la regulación del tiempo de floración, centrándonos en PIF5 por estar descrita su implicación en la promoción de la floración en plantas sobre-expresantes, en condiciones de LD y SD (Fujimori et al., 2004). Nos

interesó estudiar en detalle si en condiciones de SD, éste y otros factores PIF podrían actuar en la regulación del tiempo de floración, aunque no parecen hacerlo en condiciones de LD (Shin et al., 2009). Posteriormente, durante el transcurso de este estudio se ha detectado un posible sitio de unión de PIF5 a *TEM2* mediante análisis de ChIP-seq, lo que nos sugería que podría existir cierta relación entre los PIF y TEM (Hornitschek et al., 2012).

Por todo ello, analizamos la expresión de *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en las plantas mutantes *pif4*, *pif5*, *pif4pif5* y las sobre-expresantes *35S::PIF4* y *35S::PIF5* cultivadas en SD a 22°C durante 3 semanas. No observamos cambios en los niveles de mRNA de *FT* en las plantas *pif4*, *pif5* ni *pif4pif5* (Fig 49a). A pesar de que la gráfica muestra un cierto cambio de expresión en los niveles de mRNA, éste no es significativo, tal y como indican las barras de error. Si analizamos en detalle los datos de Ct obtenidos en la cuantificación realizada mediante RT-qPCR (Fig. 49c), podemos comprobar que apenas varían y que estamos en una zona de difícil cuantificación, al obtener unos Ct próximos al que presenta el control negativo. Con unos Ct tan altos, la probabilidad de introducir errores técnicos es mayor. En cambio, observamos un incremento de expresión muy claro en las plantas *35S::PIF5*, cuyos altos niveles de *FT* (Fig. 49b) se correlacionarían con la floración temprana observada (Fujimori et al., 2004). Por otra parte, aunque las plantas *35S::PIF4* muestran unos niveles de *FT* más altos que las plantas silvestres, éste cambio es mucho menor que en las plantas sobre-expresantes de PIF5.

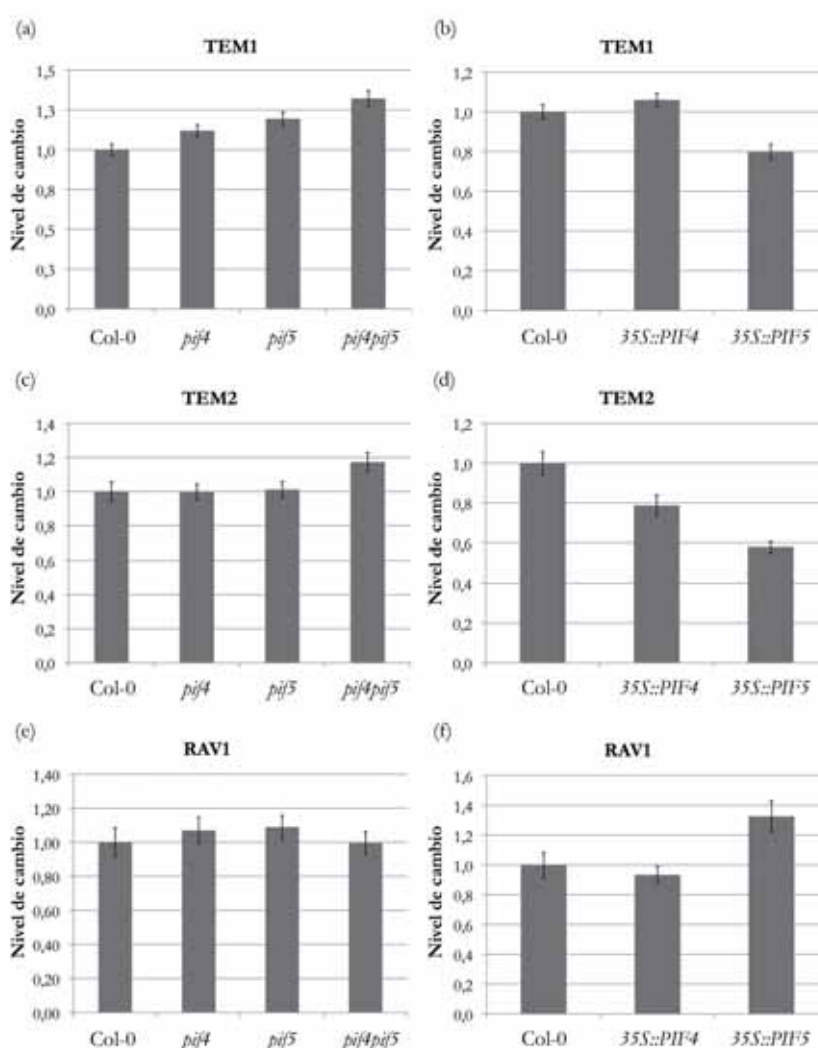


**Figura 49. Niveles de mRNA de *FT* en plantas mutantes y sobre-expresantes de PIF4 y PIF5**

Análisis de los niveles de mRNA de *FT* en las plantas silvestres Col-0, mutantes *pif4-101*, *pif5-1* y *pif4-101 pif5-1* (a) y sobre-expresantes *35S::PIF4* y *35S::PIF5* (b) cultivadas durante 3 semanas en SD a 22°C y recogidas a ZT12. (c) Valores de Ct que representan el ciclo de amplificación en qPCR cuantitativa. NTC representa el control negativo. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

El análisis de los genes *TEM/RAV* en las mismas muestras, muestra que el nivel de cambio de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* es muy pequeño y no significativo (Fig. 50). Únicamente en *TEM1* parece haber un cierto efecto en las plantas *pif4 pif5*, con una expresión ligeramente incrementada respecto a los valores de las plantas control Col-0 (Fig. 50a). Sin embargo, este cambio no parece correlacionarse con un descenso en los valores de *FT* en estas plantas.

La cuantificación de los niveles de mRNA de *TEM/RAV1* en las plantas *35S::PIF4* y *35S::PIF5* (Fig. 50b,d,f) nos indica que la sobre-expresión de *PIF4* tiene un efecto poco significativo, con un ligero descenso en los niveles de *TEM2* pero sin efecto en *TEM1* o *RAV1*. Por el contrario, *35S::PIF5* sí reduce ligeramente los niveles de *TEM1* y *TEM2*, lo que podría relacionarse con el incremento en los valores de *FT* observados (Fig. 49b), e incrementa los niveles de *RAV1* en una magnitud parecida al efecto observado para *TEM1*, pero en sentido inverso.

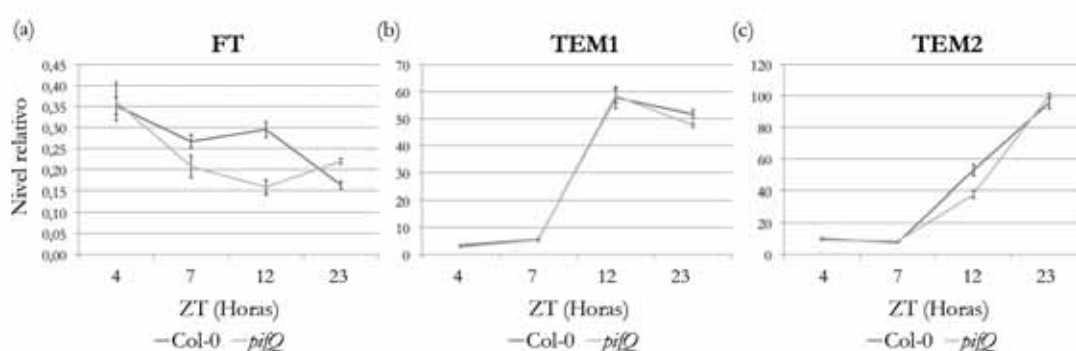


**Figura 50. Niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en las plantas mutantes y sobre-expresantes de *PIF4* y *PIF5***

Análisis de los niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres Col-0 y (a) plantas mutantes sencillos *pif4-101*, *pif5-1* y el doble *pif4-101 pif5-1*; (b) plantas sobre-expresantes *35S::PIF4* y *35S::PIF5*. Todas ellas han sido cultivadas durante 3 semanas en condiciones de SD 22°C y recogidas a

ZT12. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

Para finalizar estos estudios de expresión, nos propusimos realizar un estudio más detallado de la expresión de *TEM1* y *TEM2* en el cuádruple mutante *pifQ*, sabiendo que la función de los PIF es redundante en algunos procesos, y a lo largo de 24 horas, por si se producía un cambio en otro momento del día que no estuviéramos detectando al recoger una única muestra. Para ello cultivamos plantas silvestres Col-0 y *pifQ* en SD durante 3 semanas (para una mejor detección de los niveles de *FT*) y recogimos muestras en los puntos ZT4 (punto central del periodo de luz), ZT7 (antes de la transición luz-oscuridad), ZT12 (pico de expresión de *TEM1*) y ZT23 (última hora de la noche, momento de acumulación de las proteínas PIFs) (Fig. 51).



**Figura 51. Niveles de mRNA de *FT*, *TEM1* y *TEM2* en las plantas *pifQ***

Análisis de los niveles de transcrito de (a) *FT*, (b) *TEM1* y (c) *TEM2* en plantas silvestres Col-0 (gris oscuro) y cuádruple mutante *pifQ* (gris claro) cultivadas en placa 0,5MS- en condiciones de SD durante 3 semanas. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

Los resultados obtenidos mediante RT-qPCR nos confirman que en las plantas *pifQ* hay una clara reducción de los niveles de mRNA de *FT*, lo que tendría sentido según el cambio esperado, ya que si el cuádruple mutante *pifQ* tuviera un efecto en floración sería en este sentido. Sin embargo, este cambio no va acompañado de un incremento en los niveles de *TEM1* o *TEM2*. De manera que podemos concluir que los PIFs no parecen regular la transcripción de los genes *TEM* en estas condiciones, ya que únicamente hemos observado un cierto efecto cuando se sobre-expresa PIF5, pero no en los mutantes.

La importancia de los cambios observados mediante cuantificación de los niveles de mRNA podría no tener relevancia biológica, como ocurre en LD. Por ello, realizamos experimentos de análisis del tiempo de floración de aquellos genotipos que han mostrado cambios relevantes en la expresión de *FT* y *TEM1* o *TEM2*. En concreto, nos hemos centrado en las plantas *35S::PIF5* y las plantas *pifQ* y hemos analizado su floración en SD (Tabla 14) y LD a 22°C (Tabla 15) y la hemos comparado con la de *tem1 tem2*.



Genotipo	Tiempo de floración			
	Roseta <sup>a</sup> ± SD <sup>e</sup>	Caulinar <sup>b</sup> ± SD	Totales <sup>c</sup> ± SD	Días <sup>d</sup> ± SD
<b>Experimento 1</b>				
Col-0	58,8 ± 2,9	7,1 ± 1,6	65,2 ± 3,1	68,5 ± 2,1
<i>tem1-1tem2-2</i>	19,8 ± 4,6	3,6 ± 0,9	23,3 ± 5,2	36,0 ± 3,0
<i>35S::PIF5</i>	31,5 ± 2,5	3,9 ± 0,7	35,4 ± 2,9	68,2 ± 1,7
<i>pifQ</i>	54,6 ± 6,7	8,2 ± 1,3	62,8 ± 7,6	NQ
<b>Experimento 2</b>				
Col-0	58,4 ± 2,5	8,3 ± 0,9	66,7 ± 2,3	67,5 ± 3,1
<i>tem1-1tem2-2</i>	19,6 ± 6,3	3,2 ± 0,7	22,8 ± 6,4	33,5 ± 4,3
<i>35S::PIF5</i>	30,3 ± 1,9	3,9 ± 0,9	34,2 ± 2,3	58,7 ± 3,0

**Tabla 14. Tiempo de floración de plantas mutantes y sobre-expresantes de PIFs, SD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), número de hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulinar) y número de hojas totales (<sup>c</sup> Totales) además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 9 y 13 por genotipo/experimento. La significación estadística realizada mediante análisis de la varianza ANOVA-1 vía y el posterior test de comparaciones múltiples de Bonferroni, se encuentran en el anexo (Anexo – Tabla 14).

Genotipo	Tiempo de floración			
	Roseta <sup>a</sup> ± SD <sup>e</sup>	Caulinar <sup>b</sup> ± SD	Totales <sup>c</sup> ± SD	Días <sup>d</sup> ± SD
<b>Experimento 1</b>				
Col-0	10,4 ± 0,5	2,5 ± 0,5	13,1 ± 0,8	19,1 ± 0,8
<i>tem1-1tem2-2</i>	5,7 ± 0,5	3,0 ± 0,5	8,8 ± 1,0	12,8 ± 0,4
<i>35S::PIF5</i>	4,6 ± 0,5	2,3 ± 0,5	6,9 ± 0,8	14,7 ± 0,6
<i>pifQ</i>	10,8 ± 0,9	2,4 ± 0,5	13,2 ± 1,2	18,6 ± 0,7
<b>Experimento 2</b>				
Col-0	11,2 ± 1,1	2,7 ± 0,5	13,9 ± 1,3	20,3 ± 1,6
<i>tem1-1tem2-2</i>	6,2 ± 0,5	2,6 ± 0,5	8,9 ± 0,6	13,6 ± 0,5
<i>35S::PIF5</i>	5,4 ± 0,8	1,7 ± 0,5	7,1 ± 1,1	14,3 ± 0,5

**Tabla 15. Tiempo de floración de plantas mutantes y sobre-expresantes de PIFs, LD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), número de hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulinar) y número de hojas totales (<sup>c</sup> Totales), además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 7 y 12 por genotipo/experimento. La significación estadística realizada mediante análisis de la varianza ANOVA-1 vía y el posterior test de comparaciones múltiples de Bonferroni, se encuentran en el anexo (Anexo – Tabla 15).

En las condiciones de SD en las que hemos realizado los experimentos de expresión, las plantas *pifQ* no muestran cambios significativos en el tiempo de floración, como ya apuntaban Shin y colaboradores (2009), en condiciones de LD. Por tanto, el cambio en los niveles de *FT* detectado no tiene relevancia biológica, ya que no es capaz de adelantar la floración de estas plantas. Se ha propuesto que *FT* induciría la floración una vez superado un determinado umbral que fluctúa entre un nivel mínimo y un máximo, de manera que los cambios observados podrían situarse en un rango que no conlleva cambios fenotípicos (Kardailsky et al., 1999). Las plantas *35S::PIF5* muestran un adelanto del tiempo de floración (Fujimori et al., 2004), lo que podría correlacionarse con el incremento en los niveles de *FT* y un posible descenso en los niveles de *TEM1* y, sobretodo, de *TEM2* observados (Fig. 50). La floración de en estas condiciones no es tan temprana como la de *tem1 tem2* ni como la de *phyB* (Tabla 15).

En condiciones de LD, *pifQ* tampoco muestra cambios en el tiempo de floración respecto a las plantas silvestres, y *35S::PIF5* adelanta su floración llegando a florecer incluso más temprano que *tem1 tem2* (analizando el número de hojas de roseta no hay diferencia estadísticamente significativa, pero sí la hay si tenemos en cuenta el número de hojas totales) (Fig. 52; Tabla 15). Esto indica que la floración de las plantas *35S::PIF5* se adelanta incluso más en condiciones de fotoperiodo favorable.



**Figura 52. Fenotipo de las plantas *35S::PIF5* comparado con el doble mutante *tem1 tem2***  
Fenotipo de floración de las plantas (de izquierda a derecha) control Col-0, *35S::PIF5* y *tem1 tem2* cultivadas durante 20 días en LD a 22°C

En conjunto, todos estos datos nos indican que el fenotipo de floración temprana de las plantas *35S::PIF5* se correlaciona con unos altos niveles de *FT*, y descenso de *TEM*, especialmente *TEM2*, en condiciones de SD a 22°C. Sin embargo, ni los mutantes sencillos *pif5*, ni el cuádruple *pifQ* muestran cambios en el tiempo de floración ni en los valores de *FT* o *TEM*, lo que indica que no están implicados en el control del tiempo de floración en estas condiciones.

## 2.2 Identificación de posibles proteínas reguladoras de TEM1

Una parte importante de esta tesis se ha centrado en identificar qué rutas y qué factores regulan la expresión de *TEM1* y *TEM2* (y secundariamente, *RAV1*), por lo que nos planteamos realizar, en paralelo al resto de experimentos, un ensayo de híbrido sencillo en levadura (Y1H) e identificar las proteínas que interactúan de manera directa en condiciones de cultivo estándar de fotoperiodo y temperatura (LD a 22°C).

Para decidir qué fragmento se utilizaba en el Y1H, realizamos un estudio bioinformático de los promotores de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1*. Este estudio *in silico* nos ha permitido saber que vamos por el buen camino al relacionar estos genes con factores que regulan la expresión génica mediante respuestas dependientes de los fotorreceptores. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos al analizar las 3 kb más próximas al codón de iniciación ATG de cada uno de estos 3 genes mediante la base de datos AGRIS (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu>) de la Universidad de Ohio (Tabla 16). Se muestran únicamente los elementos relacionados con la regulación por la luz.

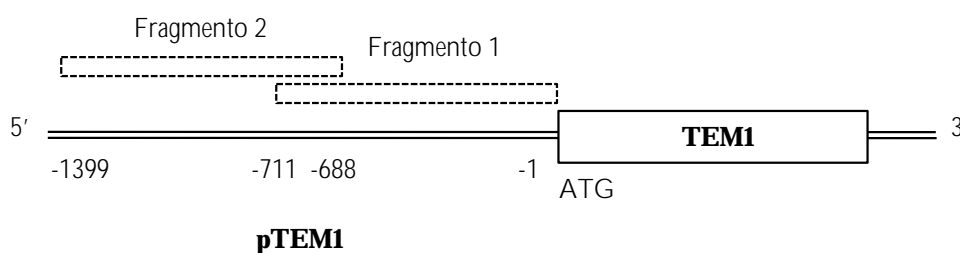
En el caso de *TEM1*, hemos localizado diferentes elementos relacionados con la regulación por fitocromos y otros factores. Se han localizado abundantes cajas GATA (I-box) presentes en los promotores reprimidos por phyA (Tepperman et al., 2001) dos secuencias SORLREP, presentes en los promotores que son reprimidos por luz, y un posible sitio de unión para los factores de transcripción VOZ (Mitsuda et al., 2004), muy similar a las secuencias sub-óptimas de unión publicadas recientemente para estos factores (Celesnik et al., 2013), y que presenta un único cambio respecto a la secuencia consenso).

El promotor de *TEM2* también presenta multitud de cajas GATA y dos elementos de represión SORLREP. Además se ha localizado un elemento Z-box identificado como uno de los sitios de unión de HY5 (el otro elemento al que se une son las G-box) (Yadav et al., 2002), y un sitio para MYB4, regulador negativo de las respuestas a la luz UV-B (Jin et al., 2000). Respecto a su posible regulación por PIF, también se ha localizado un posible sitio G-box alternativo, denominado PBE-box, al que parece unirse PIF1, PIF3 y PIF4 (Zhang et al., 2013).

Por último, el promotor de *RAV1* contiene multitud de secuencias GATA, dos G-box, que reconocen (entre otros) los factores PIFs, y relacionadas con genes que están inducidos por la luz u hormonas y, una secuencia SORLIP, presente en los genes inducidos por la luz.

Así, los genes *TEM/RAV* tienen en sus promotores una buena representación de secuencias clasificadas como elementos de respuesta a la luz. *TEM1* y *TEM2* tienen promotores ricos en secuencias para represores, lo que se podría relacionar con el pico de expresión nocturno que presentan ambos. En cambio, *RAV1* tiene secuencias de reconocimiento para factores implicados en la inducción por la luz, que podrían controlar su pico de expresión durante las horas de luz.

Con esta información, se clonaron varios fragmentos de los promotores de *TEM1* y *TEM2* en vectores pHISi-1. Para simplificar el escrutinio, se decidió empezar con dos regiones parcialmente solapantes del promotor de *TEM1* (*pTEM1*-fragmento 1 y *pTEM1*-fragmento 2), de aproximadamente 700 nt cada una, de manera que abarcamos los 1400 nt más cercanos al ATG (Fig. 53).



**Figura 53. Esquema de la distribución de los fragmentos utilizados para el ensayo de Y1H en el promotor de TEM1**

Se muestra la situación en el promotor de *TEM1* de los dos fragmentos ("Fragmento 1" y "Fragmento 2") clonados para la realización del ensayo de híbrido sencillo en levadura (Y1H). Además se detalla su posición ligeramente solapante, para cubrir un total de, aproximadamente, 1400 pb.

Nombre	Descripción	Consenso	Encontrada	Localización
<b>pTEM1</b>				
ACE	Elemento de respuesta a la luz azul y UV	GACACGTAGA	<u>ACACGTATA</u>	-472
Box II (GT-1)	Elemento común asociado con promotores regulados por la luz	GGTTAA	<u>GGTTAA</u>	-1137
GATA (I-box)	Elemento común compartido por los genes regulados por la luz (fitocromos), sobre-representado en los genes reprimidos por phyA	GATAAG	<u>GATAA/GATAAG</u>	-2780/-2711/-2481/ -2468/-2192/-1573/ -1389/
SORLIP1	Sobre-representado en los promotores inducidos por la luz	AGCCAC	<u>AGCCAC</u>	-1506
SORLREP2	Sobre-representado en los promotores reprimidos por la luz	ATAAAACGT	<u>TAAAAC</u>	-354
SORLREP3	Sobre-representado en los promotores reprimidos por la luz	TGTATATAT	<u>TGTATATAT</u>	-100
T-Box	Mutaciones en la caja T-Box provocan una reducción de la transcripción de los genes activados por la luz	ACTTTG	<u>ACTITG</u>	-1613
VOZ	Sitio de unión de factores VOZ, activadores de la floración mediada por phyB	GCGT(N7)ACGC	<u>GCGT(N6)ACGT</u>	-1286
bZIP	Sitio de unión de factores bZIP, implicados en señalización de luz y desarrollo floral, entre otros	ACTCAT	<u>ACTCAT</u>	-2504/-1934/-767
<b>pTEM2</b>				
GATA (I-box)	Elemento común compartido por los genes regulados por la luz (fitocromos), sobre-representado en los genes reprimidos por phyA	GATAAG	<u>GATAA/GATAAG</u>	-2804/-2288/-2064 -1870/-1551/-1192 -1067/-1007/
MYB4	Relacionado con respuestas a luz UV-B	A(A/C)C(A/T)A(A/C)C	<u>AACAAAC</u>	-414
SORLREP1	Sobre-representado en promotores reprimidos por luz	TATACTAGT	<u>TATACTAGT</u>	-726
SORLREP3	Sobre-representado en promotores reprimidos por luz	TGTATATAT	<u>TGTATATAT</u>	-149
PBE-box	Sitio alternativo de unión de los factores PIF, G-box modificada	CACATG	<u>CACATG</u>	-1715
Z-box	Implicado en la regulación inducida por luz. Relacionado con HY5 y COP1	ATACGTGT	<u>ATACGTGT</u>	-2054
bZIP	Sitio de unión de factores bZIP, implicados en señalización de luz y desarrollo floral, entre otros	ACTCAT	<u>ACTCAT</u>	-742
<b>pRAV1</b>				
ACE	Elemento con respuesta a luz azul y UV	GACACGTAGA	<u>ACACGTATA</u>	-95
GATA (I-box)	Elemento común compartido por todos los genes regulados por luz, mediado por la ruta de fitocromos; sobre-representado en genes reprimidos por phyA	GATAAG	<u>GATAA/GATAAG</u>	-2467/-1588/-1358 -1039/-912/
G-box	Elemento con respuesta a inducción por luz u hormonas	CACGTG	<u>CACGTG</u>	-2111/-583
SORLIP5	Secuencia sobre-representada en promotores inducidos por luz	GAGTGAG	<u>GAGTGA</u>	-797

**Tabla 16. Análisis *in silico* de los elementos localizados en los promotores de TEM1, TEM2 y RAV1**

Se han analizado las 3 kb más cercanas al codón de iniciación ATG, mediante la base de datos AGRIS. En las secuencias encontradas en los promotores, el subrayado indica la identidad con la secuencia consenso correspondiente.

Las construcciones que contenían estos fragmentos de *pTEM1* se usaron como “cebo” contra una genoteca de cDNA de planta completa cultivada en condiciones estándar de laboratorio, y clonada en un vector pGADT7-rec. Los resultados obtenidos después de la secuenciación de 108 clones, se detallan en las siguientes tablas (Tabla 17).

<b>Fragmento 1</b>		
<b>ID Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencias</b>
AT1G22300	14-3-3-like protein GF14 Epsilon (GRF10)	2
AT1G23480	Putative mannan synthase3/Cellulose synthase-likeA3 (CSLA3)	2
AT1G25490	Enhanced ethylene response 1 (EER1 o RCN1)	1
AT1G43170	60s ribosomal protein L3-1	22
AT1G43310	Nucleotide-sugar transporter family protein	1
AT1G61790	Oligosaccaryl transferase subunit 3/6 (OST3/6)	1
AT1G63980	D111/G-patch domain-containing protein	2
AT1G65390	Phloem protein 2-like A5 (PP2-A5)	2
AT3G09870	SAUR-like auxin-responsive protein	1
AT3G12960	Seed maturation protein 1 (SMP1)	1
AT4G15030	Unknown protein	1
AT5G33370	GDSL-like lipase/Acylhydrolase superfamily protein	1
AT5G42020	Luminal binding protein (BIP2)	4
AT5G53460	NADH-dependent glutamate synthase 1 (GLT1)	1
AT5G61820	Hypothetical protein	1
	Artefactos/No se obtuvo secuencia	9

<b>Fragmento 2</b>		
<b>ID Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Secuencias</b>
AT1G14250	GDA1/CD39 nucleoside phosphatase family protein	1
AT1G17720	Protein phosphatase 2 (2A), regulatory subunit B beta isoform	1
AT1G18740	Hypothetical protein	1
AT1G23660	Unknown protein	1
AT1G24822	Unknown protein	1
AT1G42480	Unknown protein	1
AT1G43170	60s ribosomal protein L3-1	29
AT1G65390	Phloem protein 2-like A5 (PP2-A5)	4
AT1G51690	Protein phosphatase 2 (2A), regulatory subunit B alpha isoform	2
AT2G42400	Vascular plant one zing finger protein 2 (VOZ2)	2
AT2G46070	Map kinase protein (MAPK12)	1
AT3G11690	Unknown protein	1
AT3G12960	Unknown protein	2
AT3G13570	SC35-like splicing factor 30A SCL30A	1
AT3G27810	MYB domain protein 3 (MYB21)	1
AT5G19820	Embryo defective 2734	1
AT5G41740	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	1
AT5G42020	Luminal binding protein (BIP2)	1
AT5G42530	Unknown protein	1
AT5G43750	NAD(P)H dehydrogenase 18 (NDH18)	1
AT1G51690	Protein Phosphatase 2A regulatory subunit B, alpha isoform	1
AT5G53460	NADH-dependent glutamate synthase 1 (GLT1)	1
	Artefactos/No se obtuvo secuencia	2

**Tabla 17. Proteínas obtenidas en el ensayo de híbrido sencillo en levadura (Y1H) realizado con dos regiones del promotor de *TEM1***

Se muestran las proteínas detectadas en cada fragmento. (a) El fragmento 1 es el más cercano al ATG, y está comprendido entre -1 y -711 nt. (b) El fragmento 2 es parcialmente solapante con el 1 y está comprendido entre -688 y -1399 nt. Se indica el número de veces que se ha detectado la proteína después de la secuenciación.

Aparte de la gran mayoría de proteínas ribosómicas detectadas, las cuales se encuentran frecuentemente en este tipo de análisis, y una proporción de proteínas no descritas, también hemos encontrado algunas proteínas muy interesantes que están implicadas en procesos de desarrollo; como son el factor 14-3-3 GF14 y la proteína VOZ2.

El factor 14-3-3 GF14 Epsilon GRF10 (At1g22300) está implicado en el desarrollo de la semilla (Swatek et al., 2011) y en la modulación de la señal de brasinoesteroides mediante su interacción con BZR1 (Ryu et al., 2007). Además, pertenece a la familia de las proteínas 14-3-3 implicadas en el control de la floración en arroz (revisado en Taoka et al., 2013).

El factor de transcripción VOZ2, junto con VOZ1, ha sido recientemente descrito como regulador de la floración por activación de *FT* y represión de *FLC*, y mediante la interacción directa con phyB (Yasui et al., 2012). El análisis *in silico* ya apuntaba a una posible regulación de *TEM1* por VOZ, y los resultados del ensayo de Y1H nos han confirmado que la secuencia a la cual se une VOZ2 está a -1268 nt del inicio de la transcripción. Ya que la activación de *FT* por VOZ es indirecta, *TEM1* podría ser el elemento que llevase la información de VOZ hasta el activador de la floración *FT*.

### **2.3 Vascular One- Zinc finger (VOZ)**

VOZ1 y VOZ2 interaccionan de forma redundante para promover la floración. Según los datos publicados hasta el momento, las plantas mutantes *voz1 voz2* tienen una floración tardía en LD (en hojas y días), pero ninguno de los mutantes sencillos presenta diferencias en la floración respecto a las plantas silvestres. Por el contrario, el análisis en SD muestra que el doble mutante es ligeramente tardío en días pero no en hojas (Yasui et al., 2012), por lo que no podemos considerar que afecte al tiempo de floración en estas condiciones.

Para investigar si los genes *TEM* pueden estar regulados por VOZ, como sugerían nuestros resultados del análisis *in silico* y del híbrido sencillo, nos propusimos analizar su expresión en plantas deficientes y sobre-expresantes de VOZ1 y VOZ2 en condiciones de LD y SD.

Nuestros análisis de expresión y de tiempo de floración se han realizado con el alelo de VOZ1 *voz1-2* (línea de T-DNA WISC-498-492O10) publicado por Yasui y colaboradores (2012), denominado en este trabajo *voz1-1*. También hemos trabajado con dos líneas mutantes *voz2*, una de las cuales también coincide con la ya publicada, denominada *voz2-1* (línea de T-DNA SALK\_021718, Yasui et al., 2012), denominado aquí *voz2-2*; además, contamos con un segundo alelo denominado *voz2-1* (línea de T-DNA SALK\_42715), no publicado. El doble mutante con el que hemos trabajado está formado por los alelos *voz1-1 voz2-1*. Todos estos mutantes han sido cedidos por el Dr. Paco Madueño, con quien hemos establecido una colaboración, por lo que hemos mantenido la nomenclatura de uso de su laboratorio.

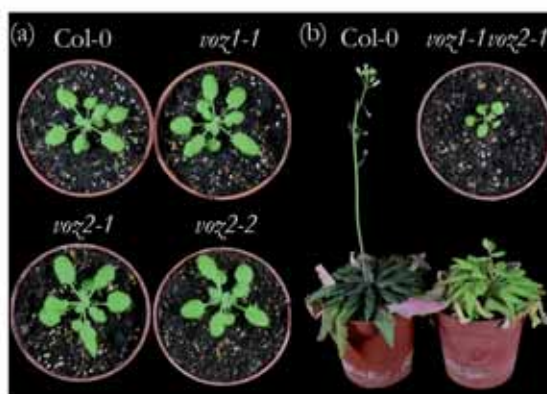
Para confirmar, en nuestras condiciones experimentales, el tiempo de floración observado previamente por otros grupos cultivamos estos mutantes en LD (Tabla 18) y SD (Tabla 19) a 22°C y cuantificamos el número de hojas y días hasta la floración.

	Tiempo de floración			Sign	Días <sup>d</sup> ±SD	Sign
	Roseta <sup>a</sup> ±SD <sup>e</sup>	Caulin <sup>b</sup> ±SD	Totales <sup>c</sup> ±SD	Total		Días
<b>Experimento 1</b>						
Col-0	11,2 ± 0,8	2,2 ± 0,4	13,3 ± 0,8	-	17,8 ± 0,4	-
<i>voz2-1</i> (+)	12,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	NQ	20,0 ± 0,0	NQ
<i>voz2-2</i>	11,5 ± 0,7	2,3 ± 0,7	13,7 ± 1,0	ns	19,2 ± 1,9	*
<i>voz1-1 voz2-1</i>	20,0 ± 1,3	3,9 ± 0,7	23,9 ± 1,7	***	30,0 ± 1,2	***
<b>Experimento 2</b>						
Col-0	12,3 ± 0,65	3,0 ± 0,6	15,3 ± 0,5	-	20,7 ± 1,0	-
<i>voz1-1</i>	12,9 ± 1,20	3,4 ± 0,5	16,3 ± 1,0	ns	21,0 ± 1,4	ns
<i>voz2-1</i>	12,7 ± 1,17	2,9 ± 0,4	15,5 ± 1,3	ns	21,2 ± 1,8	ns
<i>voz2-2</i>	13,1 ± 1,19	2,9 ± 0,4	16,1 ± 1,4	ns	21,0 ± 1,5	ns
<i>voz1-1 voz2-1</i>	25,1 ± 3,76	6,9 ± 0,5	32,0 ± 4,0	***	35,4 ± 3,7	***

**Tabla 18. Tiempo de floración de los mutantes *voz* en LD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), número de hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulin) y número de hojas totales (<sup>c</sup> Totales) además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican la significación estadística (sign.) en comparación con el genotipo silvestre Col-0 (WT) y las líneas mutantes estudiadas (Test *t*-Student) \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001; NS, No significativo (*p*>0,05), NQ, No cuantificado. Un problema en la germinación de las semillas *voz1-1* no permitió realizar el análisis en el primer experimento. (+) El insuficiente número de plantas analizado (debido a la deficiente germinación de las semillas) no nos permite realizar el análisis estadístico. Para el resto de genotipos se han utilizado entre 12 y 24 plantas por genotipo/experimento.

Los datos obtenidos en condiciones de fotoperiodo favorable (Tabla 18) confirman los datos publicados (Celesnik et al 2013; Yasui et al., 2012). Los mutantes sencillos no presentan un fenotipo de tiempo de floración alterado, pero sí el doble mutante *voz1 voz2*, que florece tarde en número de hojas y días respecto a las plantas control. Los resultados obtenidos en condiciones de fotoperiodo no inductivo (Tabla 19) también confirman los datos publicados (Yasui et al., 2012), al no observarse diferencias significativas entre los diferentes mutantes respecto a las plantas control en el número de hojas, aunque sí en el número de días en las plantas *voz1 voz2*, lo que podría indicar que estas plantas tienen afectada la velocidad de producción de hojas. Además, en nuestras condiciones de crecimiento hemos observado una afectación en el crecimiento de este doble mutante, con un evidente retraso en el crecimiento respecto a los mutantes sencillos y las plantas silvestres (Fig. 54).



**Figura 54. Fenotipo de los mutantes sencillos y doble mutante *voz1-1voz2-1* en SD a 22°C**

(a) Col-0, *voz1-1*, *voz2-1*, *voz2-2* y *voz1-1 voz2-2* (panel arriba derecha) cultivadas durante 28 días en SD a 22°C. (b) Col-0 y *voz1-1 voz2-1* una vez han florecido en SD a 22°C, alrededor de los 80 días.

	Tiempo de floración			Sign	Sign	
	Roseta <sup>a</sup> ±SD <sup>e</sup>	Caulin <sup>b</sup> ±SD	Totales <sup>c</sup> ±SD	Total	Días <sup>d</sup> ±SD	Días
<b>Experimento 1</b>						
Col-0	56,2 ± 4,9	6,9 ± 1,7	63,1 ± 6,3	-	66,2 ± 3,7	-
<i>voz1-1</i> (+)	NQ	NQ	NQ	-	NQ	-
<i>voz2-1</i>	60,8 ± 6,9	7,1 ± 1,4	67,8 ± 6,9	NS	71,7 ± 6,9	NS
<i>voz2-2</i>	59,4 ± 7,6	7,6 ± 0,7	67,0 ± 8,0	NS	67,6 ± 6,0	NS
<i>voz1-1 voz2-1</i>	50,8 ± 6,9	6,7 ± 1,1	57,5 ± 7,0	NS	84,4 ± 8,8	***
<b>Experimento 2</b>						
Col-0	58,1 ± 4,8	8,3 ± 1,0	66,4 ± 4,7	-	NQ	-
<i>voz1-1</i>	61,6 ± 3,8	7,0 ± 1,0	68,6 ± 4,6	NS	NQ	-
<i>voz2-1</i>	54,0 ± 4,4	7,9 ± 1,2	61,9 ± 4,6	NS	NQ	-
<i>voz2-2</i>	57,2 ± 5,1	7,6 ± 1,4	64,8 ± 5,0	NS	NQ	-
<i>voz1-1 voz2-1</i>	58,5 ± 8,8	7,3 ± 0,9	65,8 ± 9,0	NS	NQ	-

**Tabla 19. Tiempo de floración de los mutantes *voz* en SD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulin) y hojas totales (<sup>c</sup> Totales), además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican la significación estadística (sign.) en comparación con el genotipo silvestre Col-0 (WT) (Test *t*-Student) \**p*<0,05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001, NS, No significativo (*p*>0,05), NQ No cuantificado. (+) Un problema en la germinación de las semillas *voz1-1* no permitió realizar el análisis en el primer experimento. Para el resto de genotipos se han utilizado entre 11 y 17 plantas por genotipo/experimento.

Finalmente, al disponer de semillas sobre-expresantes de *VOZ1* (*35S::VOZ1*) decidimos analizar su tiempo de floración en LD (Tabla 20) y SD (Tabla 21). Si la sobre-expresión de *VOZ1* tuviera un efecto sobre la floración, esperaríamos que las plantas *35S::VOZ1* florecieran temprano. Sin embargo, en ambas condiciones experimentales (fotoperiodo inductivo y no inductivo) observamos que estas plantas florecen prácticamente con el mismo número de hojas y días que las plantas control Col-0. Únicamente se aprecia un cambio estadísticamente significativo en LD en el segundo experimento, que no puede relacionarse con un exceso de *VOZ1* ya que esperaríamos el fenotipo contrario.

	Tiempo de floración			Sign	Sign	
	Roseta <sup>a</sup> ±SD <sup>e</sup>	Caulin <sup>b</sup> ±SD	Totales <sup>c</sup> ±SD	Total	Días <sup>d</sup> ±SD	Días
<b>Experimento 1</b>						
Col-0	12,9 ± 0,8	3,0 ± 0,5	15,9 ± 0,8	-	17,9 ± 0,8	-
<i>35S::VOZ1</i>	13,1 ± 1,0	3,3 ± 0,8	16,4 ± 1,6	NS	18,7 ± 1,8	NS
<b>Experimento 2</b>						
Col-0	11,8 ± 0,8	2,7 ± 0,53	14,6 ± 0,8	-	22,0 ± 0,8	-
<i>35S::VOZ1</i>	15,1 ± 2,2	3,2 ± 0,54	18,2 ± 2,4	***	24,2 ± 2,2	**

**Tabla 20. Tiempo de floración de *35S::VOZ1* en LD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), número de hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulin) y número de hojas totales (<sup>c</sup> Totales) además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican la significación estadística (sign.) en comparación con el genotipo silvestre Col-0 (WT). (Test *t*-Student) \**p*<0,05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001, NS, No significativo (*p*>0,05). Se han utilizado entre 8 y 20 plantas por genotipo/experimento.



	Tiempo de floración			Sign	Días <sup>d</sup> ±SD	Sign
	Roseta <sup>a</sup> ±SD <sup>e</sup>	Caulin <sup>b</sup> ±SD	Totales <sup>c</sup> ±SD	Total		Días
<b>Experimento 1</b>						
Col-0	57,1 ± 3,1	7,4 ± 1,1	64,5 ± 2,9	-	68,5 ± 4,4	-
35S::VOZ1	58,5 ± 4,9	6,6 ± 1,0	65,1 ± 5,2	NS	75,6 ± 8,5	*
<b>Experimento 2</b>						
Col-0	58,1 ± 4,8	8,3 ± 0,9	66,4 ± 4,7	-	NQ	-
35S::VOZ1	60,4 ± 3,4	8,5 ± 1,1	69,0 ± 3,5	NS	NQ	-

**Tabla 21. Tiempo de floración de 35S::VOZ1 en SD a 22°C**

Se muestra el número de hojas de roseta (<sup>a</sup> Roseta), número de hojas caulinares (<sup>b</sup> Caulin) y número de hojas totales (<sup>c</sup> Totales) además del número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista (<sup>d</sup> Días). <sup>e</sup> SD: Desviación estándar. Se muestran 2 experimentos independientes. Los asteriscos indican la significación estadística (sign.) en comparación con el genotipo silvestre Col-0 (WT). (Test *t*-Student) \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001; NS, No significativo (*p*>0,05), NQ, No cuantificado. Se han utilizado entre 8 y 20 plantas por genotipo/experimento.

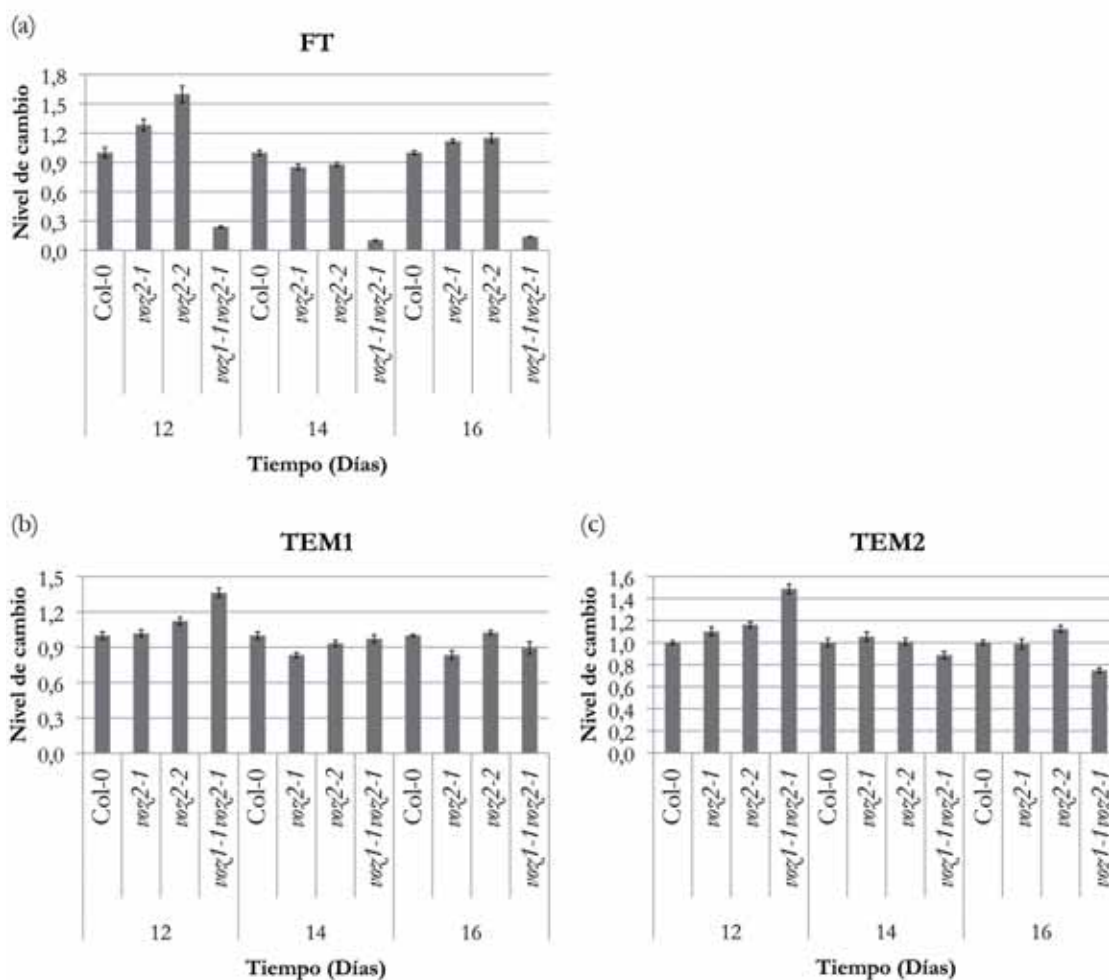
En resumen, parece que el efecto en el control del tiempo de floración de los factores de transcripción VOZ depende de manera redundante de ambos factores, VOZ1 y VOZ2, y únicamente se produce en condiciones de fotoperiodo favorable. Los datos publicados relacionan el retraso en el tiempo de floración con unos valores de *FT* significativamente reducidos en las plantas *voz1 voz2*, en LD; mientras que en condiciones no inductoras, la expresión de *FT* no parece sufrir un cambio evidente, lo que concuerda con la falta de fenotipo en esas condiciones (Yasui et al., 2012). Por el momento no se conoce la vía de regulación de *FT* y *FLC* por VOZ; se supone que no es directa ya que ninguno de los dos genes tiene sitios de unión para estos factores.

Como hemos mostrado anteriormente, el promotor de *TEM1* tiene un posible sitio de unión para VOZ2, el cual difiere de la secuencia consenso en el número de nucleótidos centrales (se reduce en un nucleótido) y en el nucleótido final del palíndromo. Este cambio del nucleótido final (de "C" a "T") ha sido recientemente aceptado como un sitio de unión sub-óptimo al que puede unirse VOZ2 (Celesnik et al., 2013) y VOZ2 se une a *TEM1* por ensayos de Y1H (Tabla 6). Esto sugiere que TEM1 podría mediar VOZ y *FT* si VOZ reprimiera la expresión de *TEM* en LD.

Como la expresión de *TEM1* y *TEM2* decae con el tiempo (con un mínimo entre los días 12-14 en LD), y suponiendo que VOZ reprimiera la expresión de *TEM1* o *TEM2*, decidimos recoger muestras a lo largo del desarrollo por si la expresión de *TEM* se veía afectada en un momento más tardío, es decir, para comprobar si la falta de VOZ era capaz de mantener a las plantas durante más tiempo sin florecer a causa de unos mayores niveles de mRNA de *TEM*; lo cual tendría sentido si consideramos que el doble mutante *voz1 voz2* florece muy tarde. Para comprobarlo, cultivamos los mutantes sencillos y el doble mutante de VOZ1 y VOZ2 en LD a 22°C, y analizamos la expresión de *FT*, *TEM1* y *TEM2* mediante RT-qPCR en plantas de 12, 14 y 16 días (Fig. 55).

Los valores de mRNA de *TEM1* (Fig. 55b) y *TEM2* (Fig. 55c) están ligeramente incrementados en el doble mutante a día 12, lo que justificaría que los niveles de *FT* sean bajos en ese momento, y que no aumenten a día 12 como ocurre en las plantas silvestres (Fig. 55a). Sin embargo, no justificaría que los niveles de *FT* sigan manteniéndose considerablemente más bajos que en las plantas silvestres hasta después del día 16, lo que sugiere que o bien otros represores deben estar reprimiendo a *FT* en etapas posteriores, o bien algún activador de *FT* está también reprimido.

Estamos finalizando la confirmación de estos resultados en otro experimento en el que hemos sembrado todos los mutantes (en el experimento anterior las semillas *voz1-1* no germinaron), y que hemos recogido en un momento más temprano del desarrollo (9 días) para comprobar si la ausencia de *VOZ* en etapas tempranas provoca un mayor incremento en *TEM*.



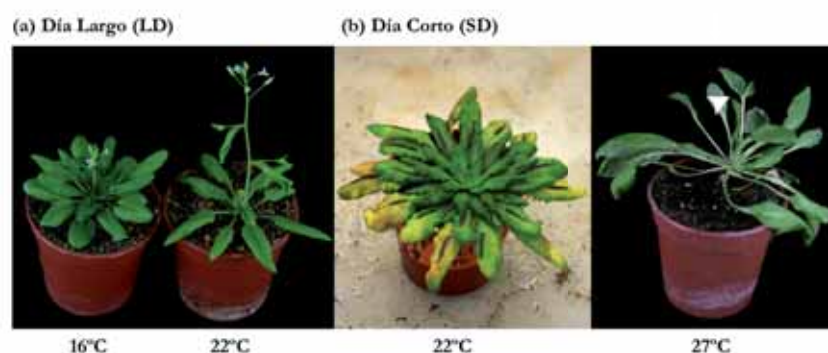
**Figura 55. Niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* en los mutantes *voz* en LD a 22°C**

Análisis de los niveles de transcrito de (a) *FT*, (b) *TEM1* y (c) *TEM2* en plantas silvestres Col-0 y en los mutantes *voz2-1*, *voz2-2* y *voz1-1 voz2-1* cultivados en tierra en LD durante 16 días. Las muestras se han recogido a ZT18 los días 12, 14 y 16. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

Por otro lado, estamos realizando cruces para obtener el cuádruple mutante *tem1 tem2 voz1 voz2* que puede confirmar si el papel de *VOZ* en el control de la floración tiene lugar a través del control de la expresión de *TEM*.

## II. EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL

Para establecer el efecto de la temperatura sobre la regulación de los genes *TEMPRANILLO* procedimos a realizar una serie de experimentos de análisis fenotípico, genético y de expresión a temperaturas de 16°C, 22°C y 27°C, en condiciones favorables (LD, 16°C y 22°C) y no favorables (SD, 22°C y 27°C) de fotoperiodo (Fig. 31). Basándonos en trabajos previos que muestran un claro efecto de la temperatura en el tiempo de floración debido a cambios en la expresión de *FT* (Blázquez et al., 2003; Balasubramanian et al., 2006) en dichas condiciones experimentales, decidimos analizar si esta respuesta era consecuencia de la afectación de los niveles de expresión de *TEM* por la temperatura.



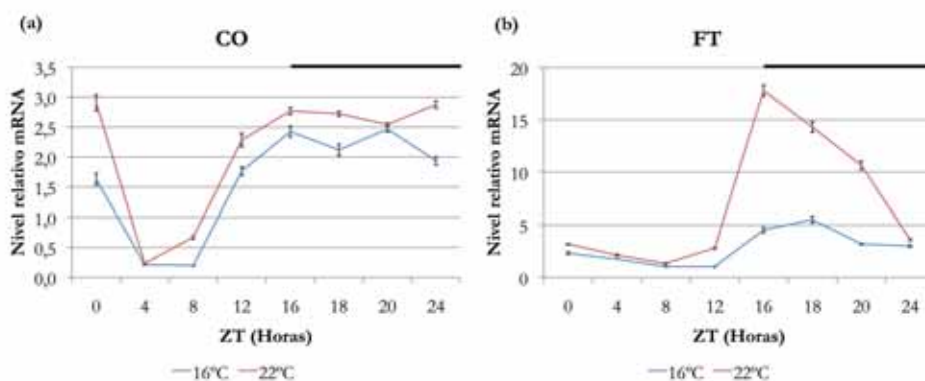
**Figura 56. Fenotipo de floración a 16°C, 22°C o 27°C y fotoperiodos de LD o SD.**

(a) Un descenso moderado de las temperaturas de 22°C a 16°C provoca un retraso en la floración en LD, mientras que (b) un ligero incremento de 22°C a 27°C promueve un adelanto en SD. Las fotografías muestran plantas silvestres Col-0 cultivadas en las condiciones arriba descritas durante 40 días en LD (a) y 63 días en SD (b). La punta de flecha señala la inflorescencia.

### ❖ FUNCIÓN DE TEMPRANILLO EN LA RESPUESTA DE LA FLORACIÓN A TEMPERATURAS BAJAS (LD a 16°C)

Las plantas cultivadas en condiciones favorables de fotoperiodo (LD) pero a baja temperatura (16°C) florecen más tarde que las cultivadas en condiciones estándar (22°C) debido a la reducción de la expresión del inductor de la floración, *FT*. En estas condiciones, el activador *CO* no muestra cambios de expresión, por lo que la regulación de *FT* parece ser independiente de éste (Blázquez et al., 2003). La figura 56 muestra la expresión de *CO* y *FT* en plantas silvestres cultivadas en condiciones de LD a 16°C o 22°C, al igual que hicieron Blázquez y colaboradores (2003). Observamos cómo *CO* prácticamente no varía su expresión al reducir la temperatura ambiental de 22°C a 16°C, mientras que la expresión de *FT* sufre un claro descenso. Este cambio está relacionado con un retraso en la floración (Fig. 57).

Por tanto, y sabiendo que los genes *TEM* son represores directos de *FT* a 22°C (Castillejo & Pelaz, 2008), quisimos ver si la reducción de la expresión de *FT* y el consiguiente retraso en la floración, era consecuencia de cambios en la expresión de *TEM*. Estos podrían estar implicados en la represión de *FT* evitando que pueda ser activado a bajas temperaturas.



**Figura 57. Niveles de mRNA de CO y FT en LD a 22°C y 16°C**

Niveles de mRNA a lo largo de 24 h de los genes (a) *CO* y (b) *FT*, en plantas silvestres Col-0 de 9 días cultivadas en condiciones de LD a 16°C o 22°C. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan el la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

## 1. EFECTO DE LA TEMPERATURA BAJA SOBRE *TEM/RAV*

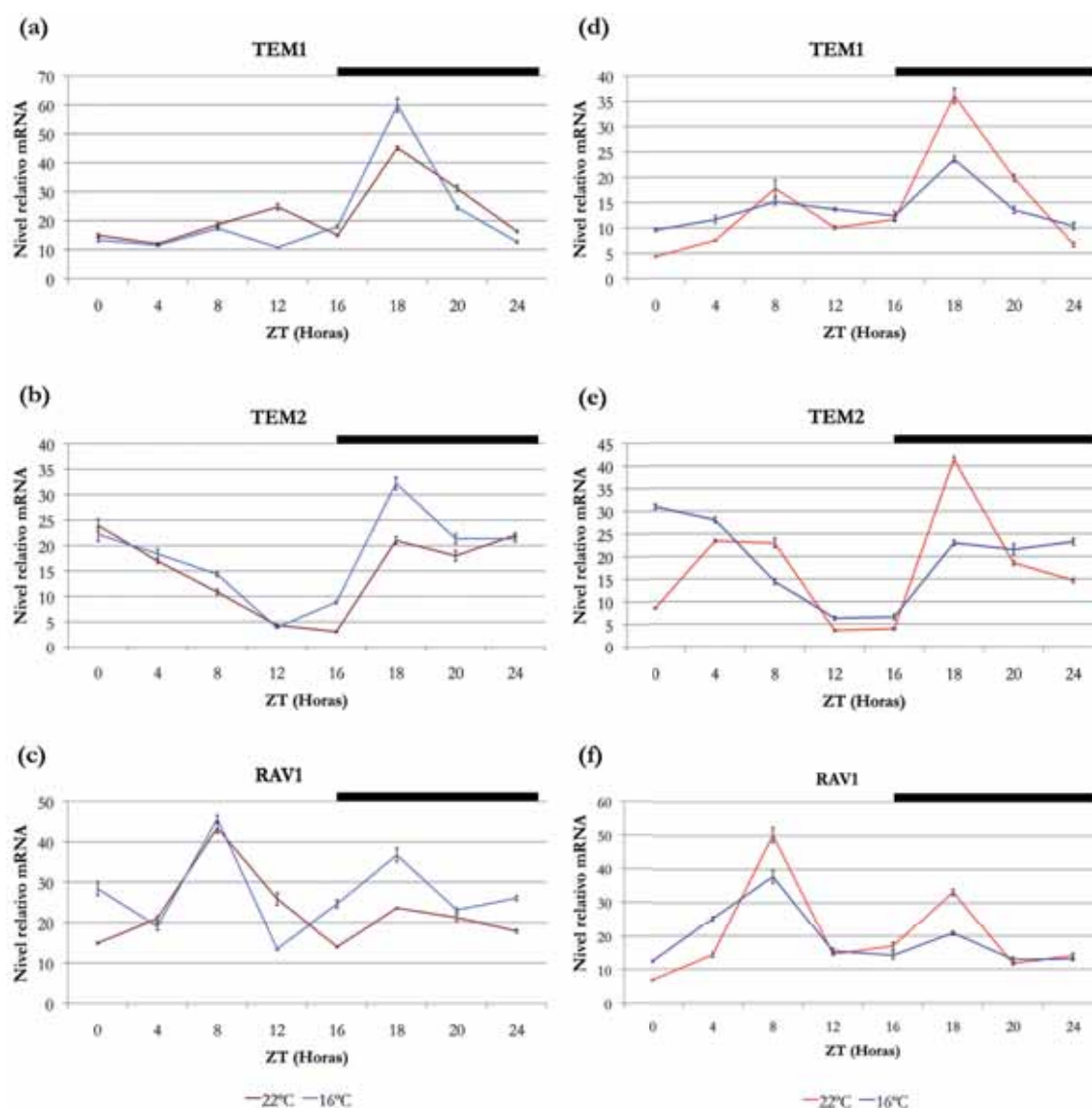
### 1.1 Regulación de la expresión de *TEM/RAV* a lo largo de 24 horas

Para establecer si el descenso en los niveles de expresión de *FT* y el retraso de la floración a 16°C era consecuencia de la regulación de *TEM*, analizamos la expresión de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1*, en condiciones de LD a 22°C y a 16°C. Para ello, cultivamos plantas silvestres Col-0 durante 9 días y recogimos las muestras cada 4 horas durante 24h, excepto en el periodo nocturno, donde se añadió un punto extra de recogida a ZT18, ya que es ahí, aproximadamente, donde se produce el pico de acumulación de *TEM1* y *TEM2* en LD (observado al realizar una recogida de muestras cada 2 horas; en el anexo, figura S-1).

La figura 58 muestra los resultados obtenidos en dos experimentos independientes. Como se puede observar en los gráficos a-c, la abundancia de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en condiciones de 16°C se incrementa muy ligeramente (visible a ZT18) respecto a la obtenida en condiciones de 22°C. Sin embargo, no podemos concluir que el cambio sea biológicamente significativo, ya que el segundo experimento (Fig. 58d-f) no muestra ese incremento en plantas que han sido cultivadas en las mismas condiciones de temperatura, pero en otra cámara de cultivo diferente (no descartamos que pueda existir un efecto por una diferencia en la calidad de la luz entre las cámaras<sup>1</sup>). Por tanto, no parece claro que en plantas de 9 días se produzca un

<sup>1</sup> Es importante tener en cuenta en qué cámara de crecimiento se han realizado los experimentos de expresión, para poder correlacionar esos resultados con los de los análisis de tiempo de floración.

incremento de los niveles de mRNA de *TEM* que explique el descenso en los valores de *FT* a 16°C. Tampoco parece claro que *RAV1* esté afectado en plantas cultivadas a 16°C durante 9 días.



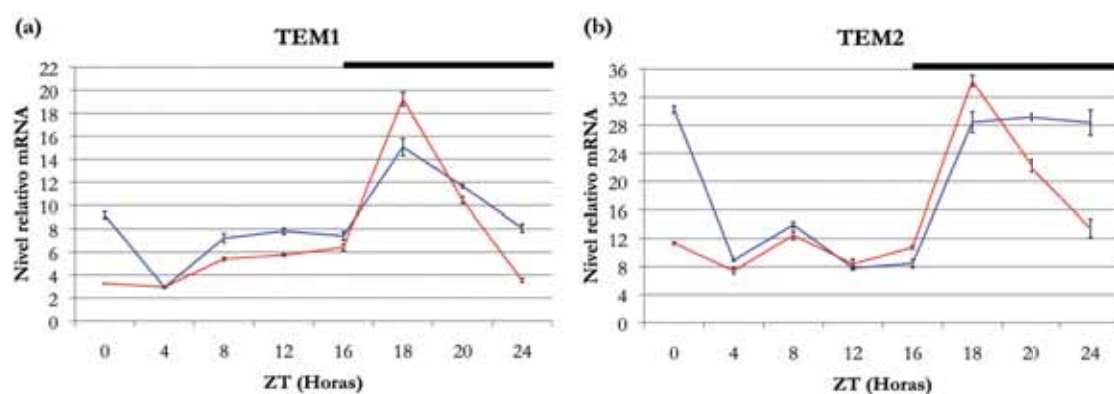
**Figura 58. Niveles de mRNA de los genes *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* a 16°C y 22°C**

Análisis de los niveles de mRNA a lo largo de 24 h, en plantas silvestres Col-0 de 9 días cultivadas en condiciones de LD a 16°C o LD a 22°C, usando la misma cámara para no alterar otras condiciones experimentales. Las gráficas (a-c) muestran los resultados obtenidos al cultivar las plantas en un fitotrón determinado [F3], y las gráficas (d-f) muestran los resultados en otro fitotrón [F2]. Entre estas cámaras de cultivo podría existir alguna ligera diferencia en la calidad de la luz, por lo que los dos experimentos no pueden considerarse estrictamente réplicas biológicas. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno. El color rojo indica temperatura alta (22°C) y el azul, temperatura baja (16°C).

Estas gráficas también muestran el patrón de mRNA de *RAV1* a lo largo de 24 horas, no descrito hasta el momento. Como se puede observar, existe una clara diferencia entre los

patrones de expresión de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1*. Los genes *TEM* presentan un claro pico nocturno a ZT18, mientras que el pico de mayor amplitud de *RAV1* se produce durante el período de luz, a ZT8, seguido de otro pico nocturno, también a ZT18. En el caso de *TEM1* parece existir un pequeño incremento por la tarde (ZT8-12), si bien su amplitud es muy pequeña; y en el caso de *TEM2*, parece claro que se produce un descenso paulatino durante las horas de luz, mostrando su máximo de expresión a lo largo del periodo nocturno (ZT18-24). Esto nos indica que la regulación de los genes de la familia *RAV* puede ser diferente, aunque sus funciones sean redundantes (en el caso de *TEM1* y *TEM2*), y que *RAV1* podría tener un papel más importante en el periodo de luz y *TEM1* y *TEM2* en el de oscuridad. Experimentos realizados en nuestro laboratorio muestran que la proteína TEM1 se detecta durante las horas de oscuridad, pero no durante el periodo diurno, en condiciones de LD, imitando el patrón de oscilación del mRNA (Osnato et al., 2012).

Las plantas cultivadas a 22°C crecen más rápido que las cultivadas a 16°C (producen más hojas en el mismo tiempo), por lo que la edad cronológica no coincide con la edad fisiológica, y podrían no encontrarse en el mismo momento del desarrollo. Para observar qué ocurre en estadios de desarrollo similares comparamos la expresión de *TEM1* y *TEM2* en plantas de 8 días cultivadas a 22°C y plantas de 15 días cultivadas a 16°C. En ese momento, las plantas tienen el mismo número de hojas (2 cotiledones, 2 hojas bien desarrolladas y los primordios visibles de las hojas 3 y 4). Se muestra la oscilación a lo largo de 24 horas de los transcritos de *TEM1* y *TEM2* a 22°C y a 16°C en estas plantas (Fig. 59). *TEM1* presenta un claro pico a ZT18 en ambas temperaturas, y un ligero incremento de los niveles diurnos en el caso de las plantas cultivadas a 16°C, que no parece significativo. La oscilación de *TEM2* a 22°C y 16°C muestra un pico que se inicia a ZT18 y se prolonga a lo largo de todo el periodo nocturno y primeras horas del periodo diurno, en plantas cultivadas a 16°C respecto a las plantas cultivadas a 22°C. Comparando los niveles obtenidos en ambas condiciones, podemos observar que al comparar plantas con edades fisiológicas similares no hay un claro incremento en los niveles de mRNA de estos genes por el efecto de las bajas temperaturas. Esto nos indica que, efectivamente, el mismo estado de desarrollo se alcanza mucho más tarde a 16°C (15 días) respecto a 22°C (8 días).

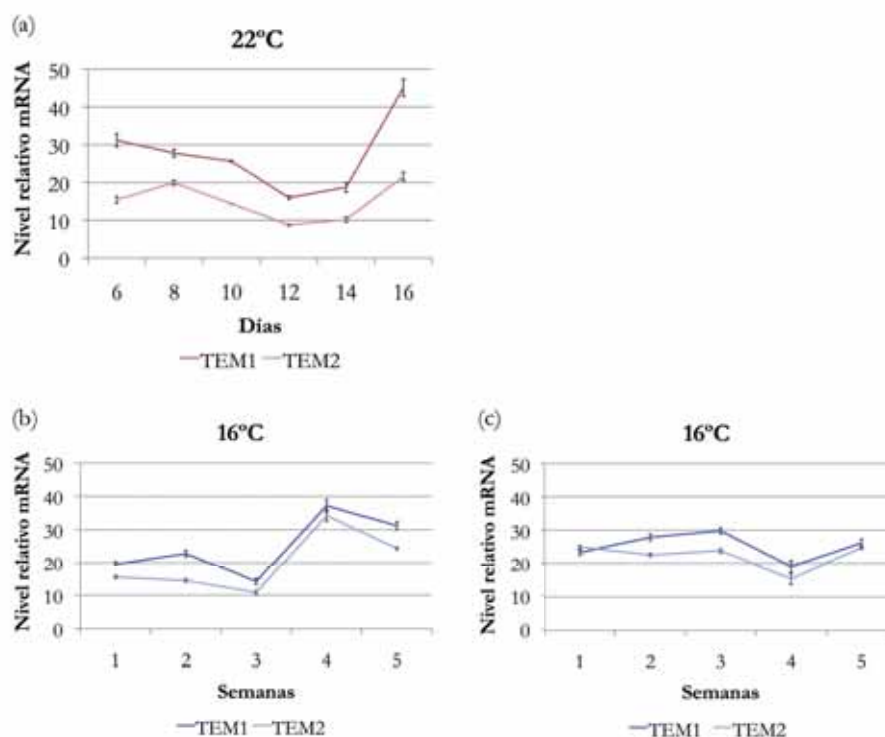


**Figura 59. Niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* en plantas de 8 y 15 días a 22°C o 16°C**

Niveles de mRNA a lo largo de 24 h, en plantas silvestres Col-0 de 8 días cultivadas en LD a 22°C (rojo), y en plantas de 15 días cultivadas en LD a 16°C (azul). (a) Expresión de *TEM1* a 22°C (rojo) y 16°C (azul). (b) Expresión de *TEM2* a 22°C (rojo) y 16°C (azul). La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

## 1.2 Regulación de la expresión de *TEM/RAV* a lo largo del desarrollo

Dado que los niveles de expresión de *TEM1* y *TEM2* disminuyen a lo largo del desarrollo, llegando a su mínimo en el momento de la inducción floral alrededor de los 12 días en LD y los 28-32 en SD (Castillejo & Pelaz 2008, Osnato et al., 2012), decidimos analizar si las bajas temperaturas afectan a *TEM* en otro momento del desarrollo, y no en las etapas iniciales, controlando de esta manera la inducción tardía de *FT*. Podría ocurrir que *TEM* presentara unos niveles altos durante las etapas iniciales del desarrollo (a 22°C y 16°C), que se siguieran manteniendo altos durante más tiempo a 16°C. Es decir, que mantengan una fase juvenil más larga para asegurar el éxito de la reproducción en condiciones no favorables de baja temperatura. Como ya hemos comentado, las plantas silvestres cultivadas a 16°C florecen más tarde que las cultivadas a 22°C, no sólo en cuanto a número de hojas se refiere, sino también en número de días (Tabla 24). Por lo tanto, analizamos la expresión de *TEM1* y *TEM2* a lo largo del desarrollo en plantas silvestres a ambas temperaturas. Para las plantas cultivadas a 22°C se recogieron muestras cada dos días, entre los días 6 y 16, mientras que para las plantas cultivadas a 16°C se recogieron cada 4 días (día 8 a 36) (Fig. 60). Para simplificar, se han representado los datos por semanas (semana 1 a 5) en el caso de las plantas cultivadas a 16°C.



**Figura 60. Niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* a lo largo del desarrollo a 16°C o 22°C**



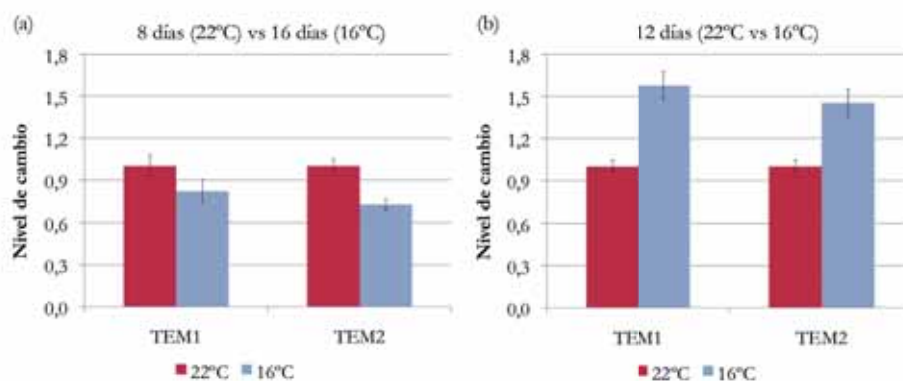
Niveles de mRNA a lo largo del desarrollo en plantas silvestres Col-0 cultivadas (a) a 22°C durante 16 días o (b) a 16°C durante 5 semanas (días 8 a 36), respectivamente. (a) Expresión de *TEM1* y *TEM2* en plantas cultivadas a 22°C y (b-c) en dos experimentos independientes de plantas cultivadas a 16°C en dos cámaras de cultivo diferentes [F3; F2]. Las plantas de los paneles a y b fueron cultivadas en la misma cámara [F3], por lo que podemos correlacionar los niveles de mRNA obtenidos. En todos los casos, las muestras se recogieron a la misma hora, durante el periodo nocturno (ZT18). La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Los tonos rojos indican temperatura alta (22°C) y los azules, baja (16°C).

La expresión de *TEM1* y *TEM2* que hemos obtenido a 22°C confirma que ésta va decreciendo con la edad de la planta (Castillejo & Pelaz, 2008) hasta que alcanza unos valores mínimos alrededor del día 12 (Fig. 60a). Por otra parte, los datos obtenidos para las plantas cultivadas a 16°C (Fig. 60b,c) muestran que los valores mínimos de *TEM1* y *TEM2* se alcanzan entre las semanas 3 y 4 (20-28 días), dependiendo de la cámara de cultivo; es decir, al menos una semana más tarde que a 22°C.

Si comparamos los valores de expresión relativa de *TEM1* y *TEM2* a 22°C y 16°C, vemos que son muy similares durante las etapas iniciales del desarrollo, es decir, no se observan niveles más altos en plantas cultivadas a 16°C que a 22°C, como ya hemos comprobado en el experimento mostrado en la figura 59. La figura 36a muestra en detalle esta comparación, entre las plantas de 8 días a 22°C y las plantas de 16 días cultivadas a 16°C, lo que aproximadamente las sitúa en la misma edad fisiológica (con un número de hojas similar). Esta comparación nos confirma que la expresión en este momento del desarrollo es similar y que no hay un incremento en los niveles de *TEM* causados por la temperatura en etapas tempranas. Sin embargo, al comparar los niveles de *TEM* en el momento en que su expresión ha alcanzado su mínimo a 22°C (12 días) con la expresión que presentan las plantas de esa misma edad cultivadas a 16°C, sí observamos mayores niveles de mRNA de los genes *TEM* a 16°C (Fig. 61b). Es decir, en plantas de la misma edad cronológica (12 días), la expresión de *TEM* a 16°C llega a su nivel mínimo más tarde.

De esta manera, un descenso moderado de la temperatura mantiene elevada la expresión de los genes *TEM* controlando que no se produzca una caída precoz y evitando así que la floración se induzca cuando la planta todavía no tiene el estado fisiológico óptimo para hacerlo.





**Figura 61. Expresión de *TEM1* y *TEM2* comparada según la edad cronológica (12 días) o fisiológica (8 días y 16 días) a 22°C y 16°C**

Comparación de los niveles de mRNA de las plantas silvestres cultivadas a 22°C y a 16°C. El panel a) muestra la comparación a una edad fisiológica aproximada (8 días a 22°C y 16 días a 16°C); el panel (b) muestra la comparación a la misma edad cronológica (12 días). La cuantificación se ha realizado mediante el método  $\Delta\Delta C_t$  a partir de los datos de las gráficas (a) y (b) de la Fig. 5, utilizando los valores a 22°C como referencia.

### 1.3 Regulación del tiempo de floración de los mutante *tem/rav*

Hemos visto que la expresión de los genes *TEM* está afectada a temperaturas bajas, pero queríamos averiguar cómo afectan estos cambios al tiempo de floración y si *TEM1* y *TEM2* son también reguladores de esta respuesta. Para ello examinamos inicialmente el tiempo de floración de los mutantes *tem1*, *tem2*, *tem1 tem2* y, debido a su conocida función a bajas temperaturas (4°C), también el de *rav1-1* (Fowler et al., 2005; Fowler & Thomashow, 2002), tanto a 22°C como a 16°C (Tabla 22).

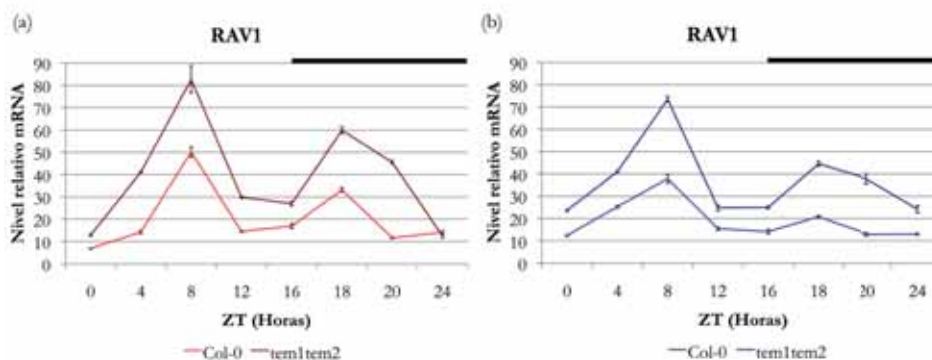
Genotipo	Tiempo de floración (Hojas $\pm$ SD <sup>d</sup> )					
	Roseta <sup>a</sup>	Caulinares <sup>b</sup>	Totales <sup>c</sup>	Fenotipo	Signific.	valor <i>p</i>
<b>LD22</b>						
Col-0	11,4 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 0,5	13,8 $\pm$ 1,1	WT	-	-
<i>tem1-1</i>	9,9 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,5	12,2 $\pm$ 0,8	Temprano	***	<0,0001
<i>tem2-2</i>	8,1 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 0,5	10,4 $\pm$ 1,1	Temprano	***	<0,0001
<i>tem1-1 tem2-2</i>	6,1 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,8	8,6 $\pm$ 0,9	Temprano	***	<0,0001
<i>rav1-1</i>	11,2 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,5	13,7 $\pm$ 0,7	WT	NS	>0,9999
<b>LD16</b>						
Col-0	20,9 $\pm$ 1,7	3,7 $\pm$ 0,7	24,7 $\pm$ 2,1	WT	-	-
<i>tem1-1</i>	18,9 $\pm$ 5,2	3,2 $\pm$ 1,0	22,1 $\pm$ 6,0	WT	NS	0,755
<i>tem2-2</i>	15,3 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,5	18,0 $\pm$ 1,3	Temprano	***	0,0008
<i>tem1-1 tem2-2</i>	14,7 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 0,5	17,2 $\pm$ 1,6	Temprano	***	<0,0001
<i>rav1-1</i>	21,4 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 0,6	25,4 $\pm$ 2,0	WT	NS	>0,9999

**Tabla 22. Tiempo de floración de los mutantes *tem1*, *tem2* y *rav1* cultivados a 22°C o 16°C**

<sup>a</sup>Roseta: Número de hojas de roseta, <sup>b</sup>Caulinares: Número de hojas caulinares, <sup>c</sup>Totales: Número de hojas totales, <sup>d</sup>SD: Desviación estándar. LD22: condiciones de día largo y 22°C, LD16: condiciones de día largo y 16°C. Los asteriscos indican la significación estadística (signific.) en comparación entre el genotipo silvestre Col-0 (WT) y las líneas mutantes estudiadas (Test *t*-Student) \**p*<0,05, \*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001, NS, No significativo (*p*>0,05). Se han analizado entre 7 y 14 plantas por genotipo y experimento.

Como esperábamos, las plantas silvestres florecen con un mayor número de hojas totales a 16°C que a 22°C (24,7 y 13,8 hojas totales, respectivamente). En cuanto a los mutantes, tanto los mutantes sencillos *tem1*, *tem2* y *rav1* como el doble mutante *tem1 tem2* siguen respondiendo a la temperatura y florecen considerablemente más tarde a 16°C que a 22°C. En condiciones de baja temperatura, el mutante sencillo *tem2* y el doble *tem1 tem2* siguen mostrando una floración temprana (18,0 y 17,2 hojas totales, respectivamente) respecto a las plantas silvestres cultivadas a esa misma temperatura (24,7 hojas); en cambio, parece que el mutante sencillo *tem1* (22,1 hojas totales) no florece significativamente más temprano que las plantas silvestres, quizás debido a la gran variabilidad presentada en este experimento.

Por otra parte, el mutante *rav1* no presenta diferencias en el número de hojas respecto a las plantas silvestres ni a 22°C ni a 16°C (13,7 frente a 13,8 hojas a 22°C; 25,4 frente a 24,7 a 16°C), por lo que *RAV1* no parece implicado en la regulación del tiempo de floración en estas condiciones. Sí se ha descrito que la expresión de *RAV1* responde a temperaturas de 4°C (Fowler et al., 2005; Fowler & Thomashow, 2002) pero no parece responder al descenso moderado de la temperatura (Fig. 58c,f). Sin embargo, sí parece responder a la ausencia de *TEM1* y *TEM2*, ya que en el doble mutante *tem1 tem2*, los niveles de mRNA de *RAV1* están incrementados tanto a 22°C como a 16°C (Fig. 62). Por tanto, el nivel de expresión es independiente de la temperatura pero dependiente de TEM. Estos resultados, junto con los experimentos de tiempo de floración, indican que *RAV1* no está implicado en la regulación de la floración en redundancia con TEM.



**Figura 62. Niveles de mRNA de *RAV1* a lo largo de 24 horas a 16°C o 22°C**

Niveles de mRNA de *RAV1* a lo largo de 24 h a (a) 22°C y (b) 16°C en plantas silvestres Col-0 y doble mutante *tem1 tem2* de 9 días cultivadas en condiciones de LD a 22°C o 16°C. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

## 2. COMPARACIÓN DEL EFECTO DE *TEM* Y *SVP* EN LA FLORACIÓN

Hemos observado que la expresión de los genes *TEM1* y *TEM2* es sensible a una disminución moderada de la temperatura (apartado 1.2), y que los mutantes siguen sintiendo la temperatura, al producir más hojas antes de florecer cuando crecen a 16°C que a 22°C (apartado 1.3). Como se ha comentado en la introducción, los cambios fenotípicos provocados por una

baja temperatura ambiental están mediados por una serie de genes bien conocidos, entre ellos *SVP/FLC*. Estos últimos, al igual que *TEM*, son represores directos de *FT*, y tienen un importante papel en su regulación a 16°C, siendo los mutantes del gen *SVP* prácticamente insensibles a la disminución de la temperatura ambiental (Lee et al., 2007).

Sabiendo que la respuesta a la temperatura está mediada por *SVP* y que la expresión de *TEM* está afectada por los cambios en la temperatura ambiental, exploramos la posibilidad de que exista una relación jerárquica entre ellos.

Para establecer una comparación entre el tiempo de floración de plantas mutantes en los genes *TEM1/TEM2* y *SVP*, analizamos el fenotipo de los mutantes *tem1 tem2* y *svp-41*, respecto a plantas silvestres Col-0 cultivadas en la misma cámara de crecimiento [F2], a 22°C y a 16°C. La tabla 23 muestra los resultados obtenidos en dos experimentos independientes.

Genotipo	Tiempo de floración (Hojas ± <sup>a</sup> SD)			Tiempo de floración (Días ± <sup>a</sup> SD)		
	Totales	Sign.	Fenotipo	Días	Sign.	Fenotipo
<b>LD22</b>						
<b>Experimento 1</b>						
Col-0	18,3 ± 0,7	***	WT	22,5 ± 0,5	***	WT
<i>tem1-1 tem2-2</i>	9,0 ± 1,0	NS	Temprano	13,1 ± 0,7	***	Temprano
<i>svp-41</i>	9,2 ± 0,4		Temprano	15,5 ± 0,7	***	Temprano
<b>Experimento 2</b>						
Col-0	14,9 ± 0,7	***	WT	21,90 ± 0,9	***	WT
<i>tem1-1 tem2-2</i>	8,1 ± 0,7	NS	Temprano	14,12 ± 0,8	NS	Temprano
<i>svp-41</i>	8,5 ± 0,5		Temprano	14,50 ± 0,5		Temprano
<b>LD16</b>						
<b>Experimento 1</b>						
Col-0	33,8 ± 2,3	***	WT	37,2 ± 0,9	***	WT
<i>tem1-1 tem2-2</i>	14,7 ± 0,8	***	Temprano	22,2 ± 0,4	***	Temprano
<i>svp-41</i>	10,3 ± 1,4	***	Temprano	20,7 ± 1,5	***	Temprano
<b>Experimento 2</b>						
Col-0	32,0 ± 1,7	***	WT	34,5 ± 1,4	***	WT
<i>tem1-1 tem2-2</i>	14,4 ± 0,9	***	Temprano	20,3 ± 0,5	***	Temprano
<i>svp-41</i>	9,9 ± 0,5	***	Temprano	18,4 ± 0,5	***	Temprano

**Tabla 23. Tiempo de floración de los mutantes *tem1*, *tem2* y *svp-41* cultivados a 22°C o 16°C**

Totales: Número de hojas totales. Días: Días transcurridos desde la siembra hasta que es visible el botón floral a simple vista. SD: Desviación estándar. LD22: día largo y 22°C, LD16: día largo y 16°C. Se han analizado entre 10 y 18 plantas por genotipo y experimento. Los asteriscos indican la significación estadística (sign.), comparación entre el genotipo silvestre Col-0 y las líneas mutantes estudiadas y de las líneas mutantes estudiadas entre ellas (ANOVA 1-vía) \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, NS, No significativo (p>0,05). El anexo-Tabla 23 muestra en mayor detalle el análisis estadístico (ANOVA 1-vía y test de comparaciones múltiples de Bonferroni) y la significación estadística obtenida en las distintas comparaciones entre genotipos y condiciones experimentales.

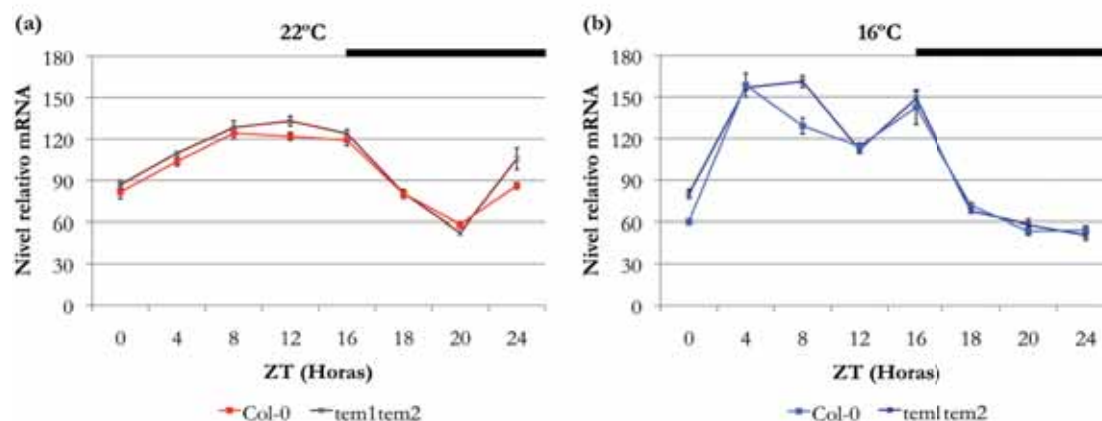
Los datos obtenidos señalan que el doble mutante *tem1 tem2* florece con menos hojas que las plantas silvestres, tanto a 22°C como a 16°C, con una diferencia promedio de unas 8 hojas menos a 22°C, y 18 hojas menos a 16°C, respecto a las plantas Col-0. Sin embargo, al comparar el doble mutante a 22°C y a 16°C, vemos que florece con un promedio de 6 hojas más a 16°C respecto a como lo hace a 22°C, lo que confirma los datos anteriores que indicaban que percibe el descenso

de temperatura y florece con más hojas (Tabla 22). Si observamos la respuesta de *svp-41* vemos que éste también florece temprano respecto a las plantas silvestres con, aproximadamente, el mismo número de hojas a 22°C y a 16°C, acorde con los resultados publicados por (Lee et al., 2007) para los alelos *svp-31* y *svp-32*. Sin embargo, sí parece existir una diferencia en el número de días, debido a que las plantas producen hojas más despacio a 16°C que a 22°C. Finalmente, al comparar *tem1 tem2* y *svp* a 22°C vemos que florecen de forma muy similar (sin diferencia significativa en el número de hojas ni en el de días), aunque sí se observan diferencias al cultivarlos a 16°C, donde *tem1 tem2* florece más tarde (diferencia estadística significativa), con un promedio de 4 hojas más que *svp-41* a esa misma temperatura.

Esta coincidencia en el tiempo de floración entre los mutantes *tem* y *svp* a 22°C podría sugerir que ambos están relacionados, como se ha publicado muy recientemente (Tao et al., 2012). Para estudiar más a fondo esta posible relación los analizamos conjuntamente.

## 2.1 Efecto de TEM sobre SVP

En primer lugar decidimos analizar el promotor y la secuencia génica de *SVP* en busca de sitios de unión para RAV, cuya secuencia consenso es C(A/C/G)ACA-N<sub>2,8</sub>-(C/A/T)ACCTG. De los posibles sitios encontrados (no mostrados), uno de ellos presenta una alta homología de secuencia con el consenso, con dos cambios nucleotídicos (CACCA-N<sub>7</sub>-CACGTG); este sitio se encuentra en el promotor a unos 2600 nucleótidos del codón ATG de iniciación de la traducción (-2661 nt). El resto de sitios presentan una homología más baja. A pesar de no mostrar una alta homología de secuencia, decidimos testar uno de los sitios más cercanos al ATG, ya que por experimentos previos de CHIP (Castillejo & Pelaz, 2008; Osnato et al., 2012), parece que TEM1 se une a las regiones 5'UTR o exones próximos al ATG. En este caso, encontramos el primer posible sitio de unión (CGATA-N<sub>5</sub>-AACATG) a 900 nucleótidos por debajo del ATG (+909 nt). Para confirmar experimentalmente esta unión, se realizó un análisis de CHIP-qPCR utilizando las plantas *35S::TEM1*, que llevan un epítopo HA fusionado a TEM1 (este experimento fue realizado por el Dr. Luís Matías, en nuestro laboratorio). El resultado obtenido confirmó la unión de TEM1 a *SVP* en plantas de 11 días (resultados no mostrados). Sin embargo, a pesar de que TEM1 parece unirse directamente a *SVP* antes de la inducción floral, éste no provoca cambios en los niveles de expresión de *SVP* (Fig. 63). La abundancia de mRNA de *SVP* es la misma en plantas silvestres y en el doble mutante *tem1 tem2* a 9 días cultivadas a 22°C o 16°C, lo que indica que TEM no parece regular la expresión de *SVP* a dichas temperaturas. Por tanto, al menos a nivel de transcripción, TEM no parece regular a *SVP* aunque se une a su secuencia.



**Figura 63. Niveles de mRNA de SVP en mutantes *tem1 tem2* a 22°C y 16°C**

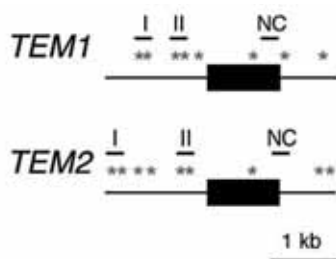
(a) Nivel de mRNA de SVP a lo largo de 24 horas en plantas silvestres Col-0 y doble mutante *tem1 tem2* a 9 días en LD a 22°C o (b) a 16°C. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

## 2.2 Efecto de SVP sobre TEM1 y TEM2

El análisis *in silico* de los promotores de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* nos indica que los tres genes presentan posibles sitios de regulación por factores de transcripción relacionados con la respuesta al frío, como los sitios ABRE-like (ABA-responsive element-like) (cuya secuencia consenso es (C/G/T)ACGTG(G/T)(A/C)) presentes en todos ellos, o los sitios LTRE (Low Temperature Response) (ACCGACA), presentes además en *RAV1* (no mostrado).

Además de los sitios de unión de proteínas de respuesta al frío, tanto el promotor de *TEM1* como el de *TEM2* presentan varios sitios de unión para los factores de transcripción de la familia MADS (SVP, SOC1, FLC, etc.), denominados cajas CArG. Este dato nos pareció relevante al sugerir una posible regulación directa de *TEM1* y *TEM2* por algún gen de la familia *MADS-box*; por ello centramos nuestro análisis en identificar las posibles cajas CArG (Fig. 64) que se encuentran en la región más cercana al codón de iniciación ATG de *TEM1* y *TEM2* (de -1500 a 0 pb). Esta parte del análisis, así como los experimentos de ChIP-qPCR (Fig. 65) para testar esas uniones, se han realizado en el laboratorio del Dr. Ji Hoon Ahn como parte de un proyecto de colaboración que ha surgido a raíz de los resultados generados en esta tesis.

Observamos que las regiones promotoras de ambos genes contienen una elevada cantidad de posibles sitios de unión de proteínas MADS, 5 en el promotor de *TEM1* y 6 en el de *TEM2*; en las regiones 3' UTR, 2 en cada uno de los genes, y por último la secuencia codificante, que contiene un único sitio en cada uno de ellos.

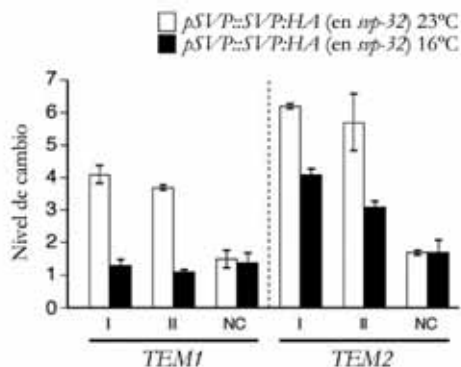


**Figura 64. Análisis de los dominios MADS en los promotores de *TEM1* y *TEM2***

Esquema de la región codificante de *TEM1* y *TEM2*. Los asteriscos señalan la localización de las cajas CArG encontradas en *TEM1* y *TEM2*. I y II, regiones con cajas CArG usadas en los experimentos de ChIP-qPCR. NC, región utilizada como control negativo en los experimentos de ChIP-qPCR. Los rectángulos negros indican las regiones codificantes.

Estos resultados van en la misma dirección que los publicados recientemente por Tao y colaboradores (2012), que demuestran la alta frecuencia de unión de SVP y SOC1 a genes de la familia *AP2*, que incluye la subfamilia *RAV* (con un solo dominio AP2). Centrándonos en SVP, los autores describieron la unión directa de SVP a *TEM1* y *TEM2* mediante experimentos de ChIP-chip en plantas *35S::SVP* de 9 días a 23°C.

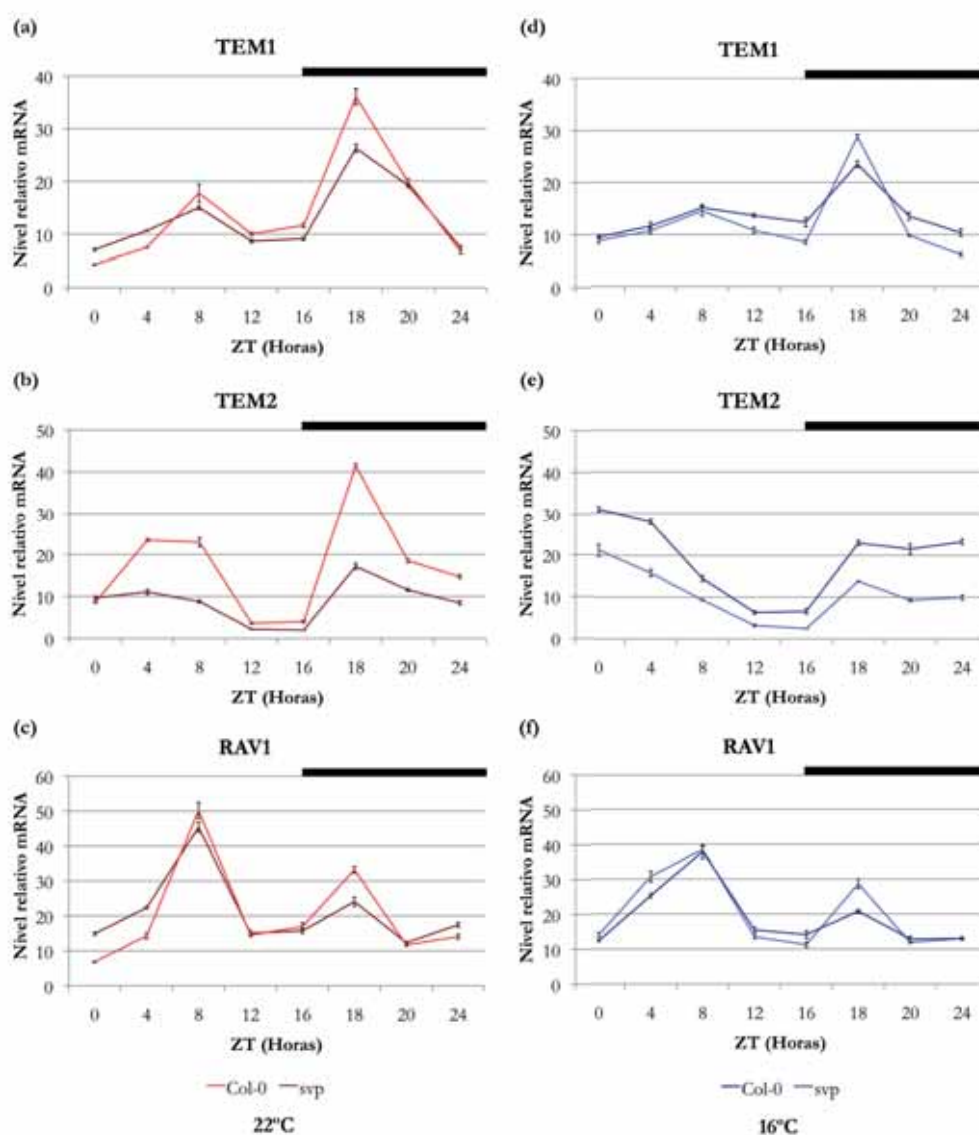
En este caso, se han usado plantas *pSVP::SVP:HA* en un fondo mutante *syp-32* cultivadas durante 9 días a 23°C y a 16°C. El análisis de ChIP-qPCR llevado a cabo por el grupo del Dr. Ahn en el marco de este proyecto ha confirmado y ampliado estos resultados, al demostrar experimentalmente que SVP es capaz de unirse a los promotores de *TEM1* y *TEM2* a 23°C, pero únicamente al de *TEM2* a 16°C (Fig. 65). Es decir, SVP podría regular de forma directa la expresión de *TEM1* y *TEM2* a 22/23°C al unirse a las regiones promotoras de estos genes, ricas en cajas de unión para los factores de transcripción MADS; y, lo que resulta más interesante, también podría regular directamente a *TEM2*, pero no a *TEM1*, en condiciones de 16°C. Parece que a 23°C la unión es similar en las dos regiones analizadas, I y II, de ambos promotores; aunque a 16°C parece más fuerte en la región I de p*TEM2* que en la II. En general, la unión a *TEM2* parece más fuerte que a *TEM1*.



**Figura 65. Análisis de la unión de SVP a *TEM1* y *TEM2* mediante ChIP-qPCR a 23°C y 16°C**

Enriquecimiento de la fracción de cromatina de dos regiones ricas en cajas CArG, posibles sitios de unión para SVP, observado en plantas de 9 días *pSVP::SVP:HA* en fondo mutante *syp-32* respecto a una región control. Las barras de error indican la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

En paralelo a los experimentos de ChIP-qPCR, también hemos realizado experimentos de expresión de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres Col-0 y plantas *svp-41* de 9 días cultivadas a 22°C o 16°C (Fig. 66). Los resultados obtenidos a 22°C (Fig. 66a-c) en las plantas *svp-41* indican que los niveles de transcrito de *TEM1* están ligeramente reducidos (27%) en su pico nocturno (ZT18), los de *TEM2* lo están entre un 50% y un 60% (prácticamente en todos los puntos analizados), y los de *RAV1*, también reducidos de manera muy ligera en su pico nocturno (ZT18). Es decir, que *SVP* actúa regulando positivamente a *TEM*, y parece tener un mayor efecto sobre *TEM2* a 22°C. El experimento equivalente en condiciones de crecimiento de 16°C (Fig. 66d-f) muestra que en las plantas *svp-41*, la abundancia de *TEM2* también está considerablemente reducida (un 35-45%), aunque no lo están ni la de *TEM1* ni la de *RAV1*. Estos datos están en clara correlación con los experimentos de ChIP-qPCR, en los que observábamos que *SVP* se une a *TEM2* a 16°C y 22°C mientras que a *TEM1* solo a 22°C.



**Figura 66.** Niveles de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en mutantes *svp* a 16°C y 22°C

Nivel de mRNA de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas silvestres Col-0 y en el mutante *svp-41* a lo largo de 24 horas, cultivadas durante 9 días en LD a 22°C o 16°C en la misma cámara de crecimiento [F2]. El color rojo (a-c) indica 22°C; el color azul (d-f) indica 16°C. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

Además, estos resultados confirman los experimentos publicados recientemente por Tao y colaboradores (2012), en los cuales analizan la expresión de *TEM1* y *TEM2* a 7, 9 y 11 días en plantas Col-0, *svp-41* y *35S::SVP* a 23°C. En ellas, el cambio más pronunciado se produce en las plantas *35S::SVP*, con un claro y significativo incremento tanto de *TEM1* como de *TEM2*; por su parte, las plantas *svp-41* presentan una ligera pero significativa reducción en los niveles de *TEM1* y *TEM2*. Tanto para las sobre-expresantes como para las mutantes, el mayor cambio se da en el nivel de *TEM2*. Todo ello confirma y valida los resultados obtenidos en nuestras condiciones. En conjunto, podemos concluir que *SVP* regula parte de la expresión de *TEM2* tanto a 22°C como a 16°C, por tanto, de manera independiente de la temperatura; y la de *TEM1* sólo a 22°C y, por tanto, de forma dependiente de la temperatura.

### 2.3 Análisis de la interacción genética entre *svp* y *tem*

Los resultados anteriores sugieren que *TEM1* y *TEM2* podrían estar actuando en parte por debajo de *SVP* a 22°C y, en el caso de *TEM2*, también a 16°C, aunque parte de la expresión de los genes *TEM* no dependa de *SVP*.

Para acabar de establecer la relación entre *SVP* y *TEM* se realizaron una serie de cruces entre los mutantes *tem1*, *tem2* y *svp-41* para obtener los dobles y triple mutantes. Estas plantas se cultivaron a 22°C o a 16°C y se realizaron análisis del tiempo de floración. Al tratarse de represores de *FT*, todas las plantas (mutantes sencillos, dobles y el triple) mostraron fenotipos de floración temprana tanto a 22°C (Fig. 67) como a 16°C (Fig. 68).



**Figura 67. Fenotipo de floración de los mutantes *tem* y *svp* en condiciones de LD a 22°C**

Fenotipos de floración de las combinaciones de mutantes sencillos, dobles y triple *tem1*, *tem2* y *svp-41*, en condiciones de cultivo de LD a 22°C después de 24 días de cultivo.



Los datos del tiempo de floración de estos genotipos indican que a 22°C (Tabla 24) cuando se elimina el efecto de TEM1, TEM2 o de ambos en un fondo mutante *svp-41*, el tiempo de floración es prácticamente el mismo que el del mutante sencillo *svp-41* o que el del doble mutante *tem1 tem2*, y menor al que presentan los mutantes sencillos *tem1* y *tem2*. La diferencia en el tiempo de floración de las distintas combinaciones de mutantes es mínima, y no son estadísticamente significativas, al florecer con prácticamente el mismo número de hojas (entre 6 y 7 hojas de roseta) y similar número de días (12 a 15) en los dos experimentos realizados.

Estos datos, junto con los datos mostrados anteriormente de ChIP-qPCR y de expresión, sugieren que a 22°C TEM1 y TEM2 actúan esencialmente por debajo de SVP; y que no parece existir un efecto aditivo, lo que indica que TEM1/TEM2 y SVP actúan en la misma ruta genética para reprimir la floración. Es decir, el efecto represor de SVP en la floración está mediado por TEM1 y TEM2.

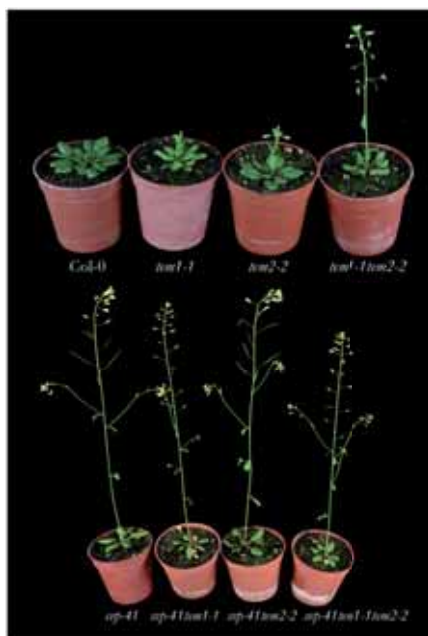
LD22	Tiempo de floración (Hojas ± <sup>a</sup> SD)			Fenotipo	Tiempo de floración (Días ± SD)	
	<sup>a</sup> Roseta	<sup>b</sup> Caulinares	<sup>c</sup> Totales		<sup>c</sup> Días	Fenotipo
<b>Experimento 1</b>						
Col-0	12,1 ± 0,9	2,8 ± 0,4	14,9 ± 1,1	WT	19,6 ± 0,8	WT
<i>tem1-1</i>	10,4 ± 0,8	2,7 ± 0,5	13,1 ± 0,9	Temprano	18,4 ± 0,6	Temprano
<i>tem2-2</i>	9,2 ± 1,3	3,0 ± 0,6	12,2 ± 1,6	Temprano	15,1 ± 1,2	Temprano
<i>tem1-1tem2-2</i>	6,9 ± 0,7	2,5 ± 0,5	9,4 ± 1,0	Temprano	14,2 ± 0,8	Temprano
<i>svp-41</i>	7,1 ± 0,7	3,1 ± 0,5	10,2 ± 1,0	Temprano	13,5 ± 0,5	Temprano
<i>svp-41tem1-1</i>	7,3 ± 0,9	2,7 ± 0,5	9,9 ± 0,9	Temprano	15,7 ± 0,8	Temprano
<i>svp-41tem2-2</i>	5,9 ± 0,3	2,6 ± 0,5	8,6 ± 0,5	Temprano	12,9 ± 0,6	Temprano
<i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	6,4 ± 0,6	2,5 ± 0,5	8,9 ± 0,6	Temprano	14,6 ± 0,6	Temprano
<b>Experimento 2</b>						
Col-0	12,3 ± 1,1	2,2 ± 0,4	14,5 ± 1,2	WT	17,3 ± 0,7	WT
<i>tem1-1</i>	10,8 ± 0,8	2,6 ± 0,5	13,4 ± 1,2	Temprano	15,5 ± 0,5	Temprano
<i>tem2-2</i>	8,3 ± 1,1	3,1 ± 0,5	11,4 ± 1,4	Temprano	13,9 ± 1,0	Temprano
<i>tem1-1tem2-2</i>	7,0 ± 0,9	2,5 ± 0,5	9,5 ± 1,0	Temprano	12,8 ± 0,7	Temprano
<i>svp-41</i>	7,6 ± 0,5	3,2 ± 0,4	10,7 ± 0,6	Temprano	13,3 ± 0,5	Temprano
<i>svp-41tem1-1</i>	8,2 ± 0,8	3,4 ± 0,5	11,7 ± 0,8	Temprano	13,2 ± 0,7	Temprano
<i>svp-41tem2-2</i>	6,1 ± 0,6	3,1 ± 0,5	9,2 ± 0,8	Temprano	12,9 ± 0,7	Temprano
<i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	6,4 ± 0,6	3,3 ± 0,5	9,7 ± 0,7	Temprano	12,6 ± 0,9	Temprano

**Tabla 24. Tiempo de floración de las combinaciones del mutante *svp-41* con los mutantes *tem* en LD a 22°C**

<sup>a</sup>Roseta: Número de hojas de roseta, <sup>b</sup>Caulinares: Número de hojas caulinares, <sup>c</sup>Totales: Número de hojas totales, <sup>d</sup>SD: Desviación estándar. <sup>e</sup>Días: Días transcurridos desde la siembra hasta que es visible el botón floral a simple vista. En cada uno de los experimentos se ha trabajado con entre 10-20 plantas de cada genotipo. El fenotipo descrito se refiere a cada genotipo mutante respecto a las plantas silvestres Col-0.

Los mismos genotipos a 16°C tienen un comportamiento similar pero no idéntico. A 16°C las plantas florecen antes si está presente la mutación *svp-41* que cuando solo se mutan los genes *TEM* anulándose totalmente la floración tardía producida por las bajas temperaturas (Fig. 68). Las combinaciones de mutantes *tem* en fondo mutante *svp* florecen prácticamente con el mismo número de hojas (sin mostrar diferencias significativas entre ellos), sin embargo el doble mutante *tem1 tem2* florece ligeramente más tarde, igual que los mutantes sencillos *tem*. En cuanto al

número de días, se sigue aproximadamente la misma correlación, siendo las plantas que florecen más temprano todas las combinaciones que portan el mutante *svp-41*, ya sea sencillo o en doble o triple combinación con *tem1* y/o *tem2* (Tabla 25).



**Figura 68. Fenotipo de floración de los mutantes *tem* y *svp* en condiciones de LD a 16°C**  
Las plantas fueron cultivadas en condiciones de LD a 16°C. La fotografía se hizo después de 32 días.

LD16	Tiempo de floración (Hojas ± <sup>a</sup> SD)				Tiempo de floración (Días ± SD)		
	Experimento 1	Roseta	Caulinares	Totales	Fenotipo	Días	Fenotipo
Col-0		20,2 ± 1,4	5,7 ± 1,0	25,9 ± 2,1	WT	30,3 ± 1,7	WT
<i>tem1-1</i>		16,3 ± 1,1	4,5 ± 0,6	20,8 ± 1,4	Temprano	25,4 ± 1,3	Temprano
<i>tem2-2</i>		13,2 ± 2,7	4,9 ± 1,2	18,1 ± 3,7	Temprano	22,3 ± 1,8	Temprano
<i>tem1-1tem2-2</i>		11,5 ± 1,0	3,8 ± 0,4	15,3 ± 1,1	Temprano	19,9 ± 1,2	Temprano
<i>svp-41</i>		8,1 ± 0,7	3,3 ± 0,5	11,4 ± 1,0	Temprano	17,7 ± 0,8	Temprano
<i>svp-41tem1-1</i>		8,3 ± 0,5	3,6 ± 0,5	11,9 ± 0,6	Temprano	18,7 ± 1,5	Temprano
<i>svp-41tem2-2</i>		6,4 ± 0,5	2,9 ± 0,5	9,2 ± 0,7	Temprano	17,9 ± 0,5	Temprano
<i>svp-41tem1-1tem2-2</i>		6,9 ± 0,7	3,1 ± 0,5	10,1 ± 0,9	Temprano	17,9 ± 0,5	Temprano
<b>Experimento 2</b>							
Col-0		18,6 ± 1,3	4,9 ± 1,0	23,5 ± 1,4	WT	29,0 ± 1,6	WT
<i>tem1-1</i>		14,4 ± 1,4	3,1 ± 0,8	17,5 ± 1,7	Temprano	24,6 ± 1,8	Temprano
<i>tem2-2</i>		13,3 ± 1,9	4,2 ± 1,0	17,5 ± 2,6	Temprano	23,3 ± 1,8	Temprano
<i>tem1-1tem2-2</i>		9,9 ± 1,1	2,9 ± 0,7	12,8 ± 1,7	Temprano	18,5 ± 2,1	Temprano
<i>svp-41</i>		6,7 ± 0,6	2,9 ± 0,5	9,6 ± 0,7	Temprano	16,2 ± 0,6	Temprano
<i>svp-41tem1-1</i>		7,4 ± 0,8	2,9 ± 0,4	10,2 ± 0,8	Temprano	16,3 ± 0,7	Temprano
<i>svp-41tem2-2</i>		6,2 ± 0,7	2,6 ± 0,5	8,9 ± 0,9	Temprano	16,3 ± 0,7	Temprano
<i>svp-41tem1-1tem2-2</i>		6,1 ± 0,7	2,7 ± 0,5	8,9 ± 0,8	Temprano	16,1 ± 0,5	Temprano

**Tabla 25. Tiempo de floración de las combinaciones del mutante *svp-41* con los mutantes *tem* en LD a 16°C**

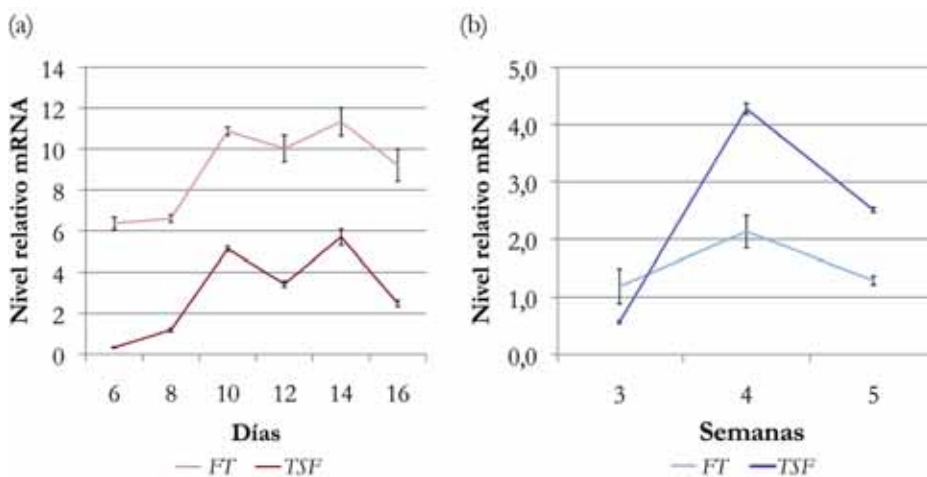
<sup>a</sup>Roseta: Número de hojas de roseta, <sup>b</sup>Caulinares: Número de hojas caulinares, <sup>c</sup>Totales: Número de hojas totales, <sup>d</sup>SD: Desviación estándar. <sup>e</sup>Días: Días transcurridos desde la siembra hasta que es visible el botón floral a simple vista. En cada uno de los experimentos se ha trabajado con entre 12-14 plantas de cada genotipo. El fenotipo descrito se refiere a cada genotipo mutante respecto a las plantas silvestres Col-0.

SVP juega, por tanto, un papel mayoritario en el control de la floración a 16°C, controlando además a *TEM2*, como veíamos en los resultados de expresión mostrados anteriormente (Fig. 66b,e). Pese a todo hay un ligero adelanto de la floración en el triple mutante que podría reflejar una función de SVP independiente de *TEM* en el control del tiempo de floración. El análisis global de los datos indica que cuando se elimina la acción de SVP, sea en un fondo mutante *tem1*, *tem2* o *tem1 tem2*, la floración es más temprana (con una diferencia sutil, pero estadísticamente significativa) que la de los mutantes *tem* correspondientes, lo que indica un efecto ligeramente aditivo y sugiere que SVP y los TEM actúan parcialmente de forma independiente. En cambio, las combinaciones de *svp* con los mutantes *tem* no son más tempranas que *svp*, lo que sugiere que también actúan en parte en la misma ruta.

En conclusión, parece que a 16°C SVP reprime la floración en parte a través de TEM y en parte a través de otro(s) gen(es), lo que explica que los mutantes *svp* florezcan más temprano que *tem1 tem2*.

### **3. EFECTO DE LOS TEM SOBRE LOS ACTIVADORES FLORALES *FT* Y *TSF***

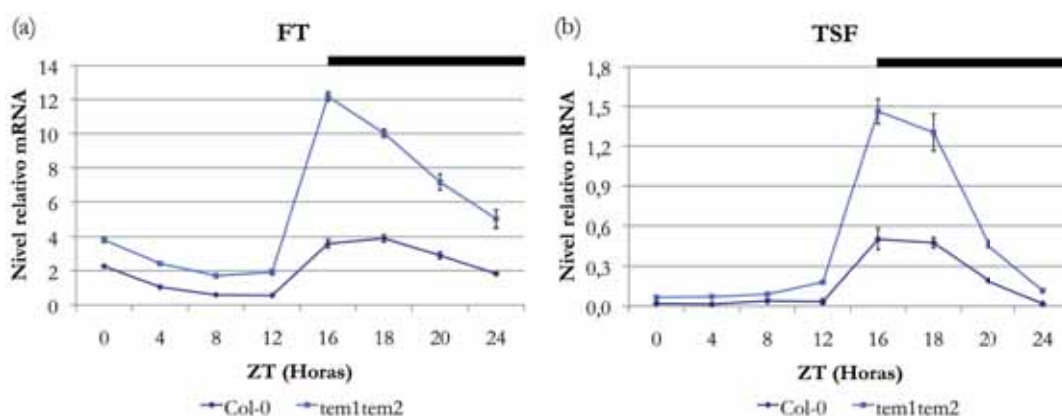
*FT* es el promotor principal de la floración en condiciones inductoras de LD. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al analizar la expresión de *TEM* (represores directos de *FT*), decidimos estudiar en detalle los niveles de *FT* a ambas temperaturas ambientales, 16°C y 22°C. Como esperábamos, y sabíamos por experimentos previos (Castillejo & Pelaz, 2008), la expresión de *FT* a 22°C se comporta de manera opuesta a la de *TEM*, incrementando a lo largo del desarrollo, hasta alcanzar su máximo aproximadamente entre los días 10-14 (Fig. 69a). Por otra parte, a 16°C, hemos detectado un pequeño incremento alrededor de la semana 4 (Fig. 69b); sin embargo el nivel alcanzado es considerablemente más bajo que en plantas cultivadas a 22°C. Al observar unos niveles tan bajos de *FT* a 16°C en el momento de la inducción floral, nos planteamos que pudiera haber otro promotor de la floración a 16°C aparte de *FT*. Uno de los homólogos más cercanos a *FT* es *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, el cual muestra similitudes de expresión y regulación con *FT* (Kobayashi et al., 1999; Yamaguchi et al., 2005); además, y más relevante para nosotros en este punto, se le ha implicado en el control de la floración a 16°C (Jang et al., 2009; Lee et al., 2007, 2012). Por ello analizamos la expresión de *TSF* en las mismas condiciones a lo largo del desarrollo. Si comparamos los niveles de mRNA máximos de *TSF* a 22°C (Fig. 69a) y a 16°C (Fig. 69b) vemos que son similares; los picos máximos se presentan, al igual que para *FT*, entre los días 10 y 14 a 22°C, y en la semana 4 a 16°C, y al comparar los niveles de *FT* y *TSF* a 22°C observamos que los de *FT* son mucho más altos, doblando los de *TSF*; sin embargo, ocurre lo contrario a 16°C, cuando *TSF* presenta un nivel mayor que el de *FT* (Fig. 69b).



**Figura 69. Niveles de mRNA de *FT* y *TSF* a lo largo del desarrollo a 22°C y a 16°C**

Se muestran los niveles de mRNA a lo largo del desarrollo de *FT* y *TSF* en condiciones de LD a (a) 22°C y (b) 16°C. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR en las mismas muestras en las que anteriormente se ha analizado la expresión de *TEM1* y *TEM2* (ver Fig. 5).

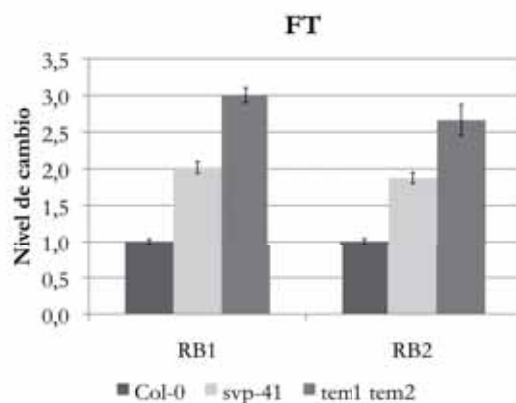
El papel represor de *TEM* a 22°C quedó demostrado al obtener una expresión de *FT* es más alta en las plantas *tem1 tem2* que en las plantas silvestres (Castillejo & Pelaz, 2008). Ahora hemos visto que ocurre lo mismo a 16°C; en las plantas *tem1 tem2*, los niveles de transcrito de *FT* se triplican respecto a los de las plantas silvestres en el pico de expresión a ZT16 (Fig. 70). Así a 16°C en ausencia de los represores *TEM1* y *TEM2*, *FT* muestra unos valores muy similares a los de las plantas silvestres cultivadas a 22°C, alrededor del día 12 cuando se produce la inducción floral (Fig. 69a). Además, hemos observado el mismo efecto sobre la expresión de *TSF*, que aumenta drásticamente cuando se eliminan los genes *TEM* (Fig. 70b). De manera que, en ausencia de *TEM*, *FT* y *TSF* aumentan sus niveles y podrían inducir la floración prematuramente.



**Figura 70. Niveles de mRNA de *FT* y *TSF* en plantas *tem1 tem2* a 16°C**

Nivel de mRNA a lo largo de 24 h de los genes (a) *FT* y (b) *TSF*, en plantas silvestres *Col-0* y doble mutante *tem1 tem2* de 9 días cultivadas en condiciones de LD a 16°C. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

Sabiendo que tanto TEM1/TEM2 como SVP son represores directos de *FT*, nos planteamos comparar su efecto sobre la expresión de *FT* utilizando plantas silvestres Col-0 y plantas mutantes *tem1 tem2* y *svp-41* a 9 días (Fig. 71).



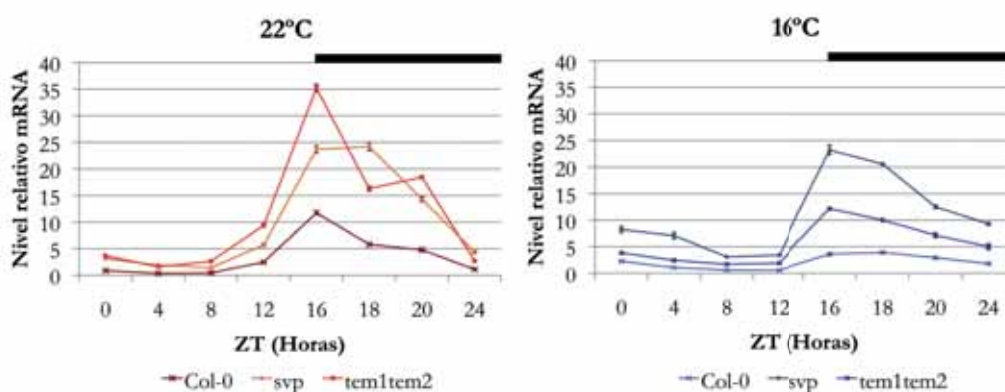
**Figura 71. Niveles de mRNA de *FT* en plantas *tem1 tem2* y *svp-41* a 22°C**

Niveles de mRNA de *FT* en plantas silvestres Col-0, doble mutante *tem1 tem2* y mutante *svp-41*, de 9 días a 22°C, recogidas a ZT16. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas. Se muestran dos experimentos independientes.

Los resultados obtenidos indican que tanto en el doble mutante *tem1 tem2* como en las plantas *svp-41*, la expresión de *FT* está incrementada con respecto a las plantas silvestres, en relación directa con el tiempo de floración temprana de los mutantes en LD a 22°C (Tabla 24).

Efecto de la temperatura sobre la expresión de *FT* en mutantes *tem1 tem2* y *svp* a 22°C y 16°C

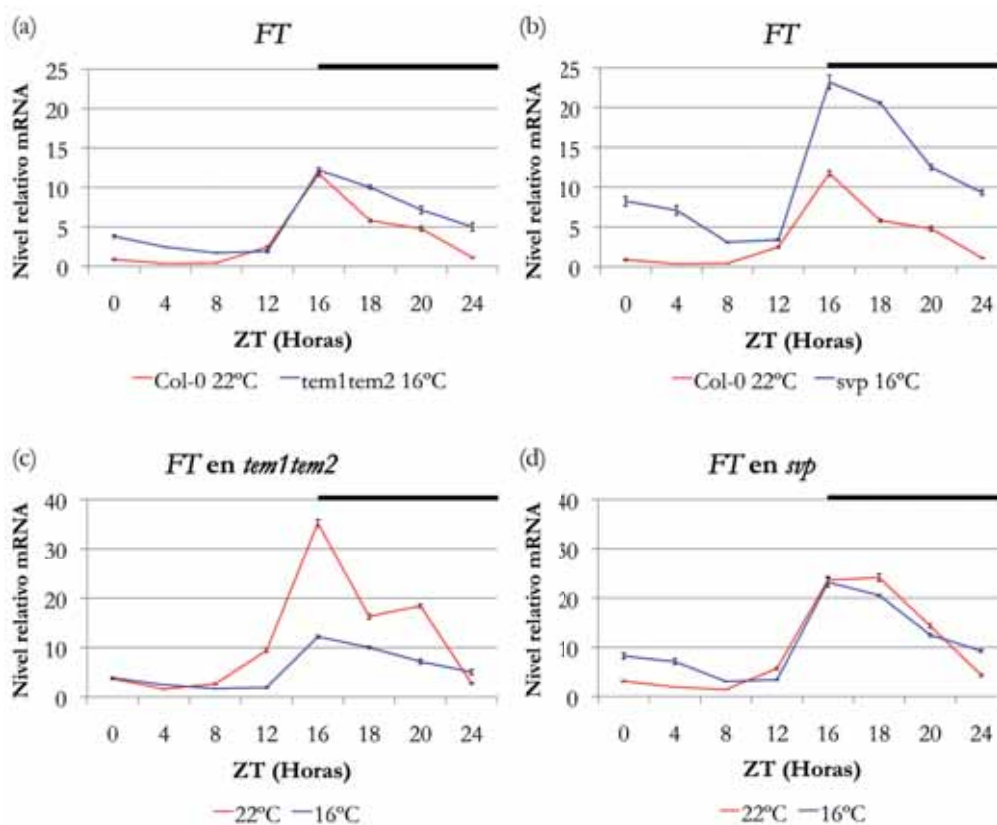
Un experimento más amplio, analizando la expresión de *FT* a lo largo de 24 horas en plantas Col-0, *tem1 tem2* y *svp-41* de 9 días cultivadas a 22°C o a 16°C, confirma que ambos mutantes presentan niveles de mRNA de *FT* más altos, pero también aparecen diferencias entre los niveles alcanzados en las plantas *tem1 tem2* y *svp* a 22°C y a 16°C (Fig. 72). A 22°C, el doble mutante presenta una mayor expresión de *FT*, mientras que a 16°C es el mutante *svp* quien parece controlar mayoritariamente los niveles de *FT*.



**Figura 72. Niveles de mRNA de *FT* en mutantes *svp* y *tem1 tem2* a 22°C y 16°C**

Niveles de mRNA a lo largo de 24 horas de *FT* en (a) plantas Col-0, *tem1 tem2* y *svp-41* a 22°C y (b) plantas Col-0, *tem1 tem2* y *svp-41* a 16°C, en plantas de 9 días. Cultivadas a 22°C o a 16°C. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

Un análisis detallado de la expresión de *FT* en estos genotipos nos permitió comprobar que, efectivamente, el nivel máximo de su mRNA en las plantas *tem1 tem2* cultivadas a 16°C es prácticamente el mismo que el de las plantas silvestres cultivadas a 22°C (Fig 73a). Este dato se correlaciona con el tiempo de floración que muestra el doble mutante *tem1 tem2* a 16°C, el cuál florece con prácticamente el mismo número de hojas totales (alrededor de 14,5 hojas promedio) que las plantas silvestres Col-0 cultivadas a 22°C (alrededor de 15,5 hojas promedio) (Tablas 13 a 15). Es decir, al eliminar los represores TEM1 y TEM2 en condiciones de baja temperatura, *FT* recupera los valores de expresión que alcanza normalmente a 22°C, y que son los que inducen la floración a esa temperatura.



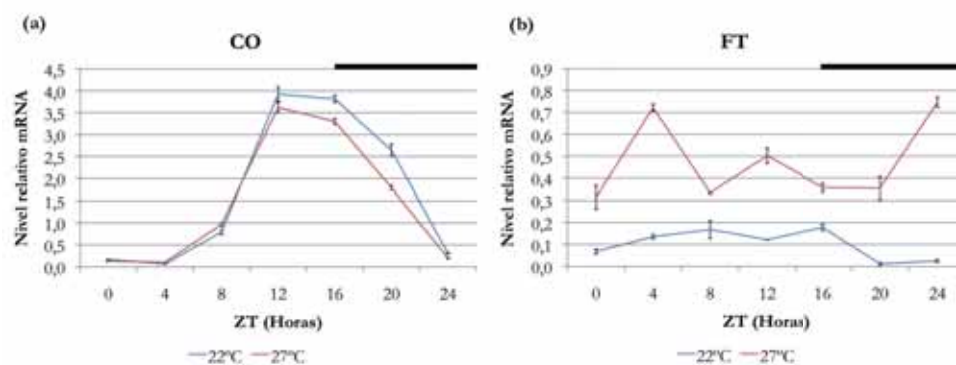
**Figura73. Comparación de la expresión de *FT* en plantas *svp* y *tem1 tem2* a 16°C y 22°C**  
 Niveles de mRNA a lo largo de 24 horas de *FT* en (a) plantas Col-0 a 22°C y *tem1 tem2* a 16°C; (b) plantas Col-0 a 22°C y *svp-41* a 16°C; (c) plantas *tem1 tem2* a 22°C y 16°C; (d) plantas *svp-41* a 22°C y 16°C; (a-d) Todas ellas son plantas de 9 días. En rojo, cultivadas a 22°C y en azul a 16°C. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La comparación se ha realizado utilizando los mismos datos que para la figura 17.

De la misma manera, si comparamos los niveles alcanzados en las plantas *svp-41* cultivadas a 16°C vemos que *FT* sobrepasa los valores que alcanzan las plantas silvestres cultivadas a 22°C (Fig. 73b); es decir, al eliminar SVP en condiciones de baja temperatura las plantas *svp-41* deberían florecer antes que las Col-0 a 22°C. De nuevo, vemos que efectivamente el incremento de *FT* en plantas *svp-41* a 16°C se correlaciona con una floración más temprana que en las plantas silvestres a 22°C (10 vs 14 hojas totales promedio, respectivamente) (Tablas 13 a 15). Al comparar la expresión de *FT* en plantas *tem1 tem2* cultivadas a 22°C o 16°C y en plantas *svp-41* también cultivadas a 22°C o 16°C, observamos que en las plantas *tem1 tem2* los niveles de *FT* a 22°C superan a los alcanzados a 16°C (Fig. 73c) pero en plantas *svp-41* cultivadas a 22°C o 16°C *FT* muestra unos valores muy similares (Fig. 73d). En ambos casos se relaciona directamente con el tiempo de floración observado anteriormente (Tablas 13, 15-16). Las plantas *tem1 tem2* florecen más tarde a 16°C (14,5 hojas totales promedio) que a 22°C (9 hojas totales promedio) y las *svp-41*, insensibles a los cambios de temperatura, florecen prácticamente a la vez a 22°C y a 16°C (10,5 hojas totales promedio).

En conjunto estos datos nos indican que a 22°C, *TEM1/TEM2* son mejores represores de *FT* que SVP; y sugieren que SVP podría ser mejor represor que TEM a 16°C.

#### ❖ FUNCIÓN DE TEMPRANILLO EN LA RESPUESTA DE LA FLORACIÓN A TEMPERATURAS ALTAS (SD a 27°C)

Las plantas silvestres Col-0 que crecen a altas temperaturas ambientales de 27°C florecen antes que las cultivadas a 22°C aunque las condiciones de fotoperiodo no sean favorables (condiciones de SD). Un ligero ascenso de la temperatura de 23°C a 25-27°C provoca un incremento en los niveles de *FT* que induce el adelanto de la floración. Este incremento no depende de cambios en su activador CO (Balasubramanian et al., 2006) que no es funcional en condiciones de SD. El hecho de que no se observen cambios en los niveles de expresión de *CO* en SD a 27°C que justifiquen el incremento de la expresión de *FT* (Fig. 74) nos llevó a estudiar si la regulación de *FT* en estas condiciones también podría ser debida a cambios en la regulación de *TEM*, tal y como hemos visto que ocurre en condiciones de baja temperatura ambiental.



**Figura 74. Niveles de mRNA de *CO* y *FT* a 22°C y 27°C en SD**



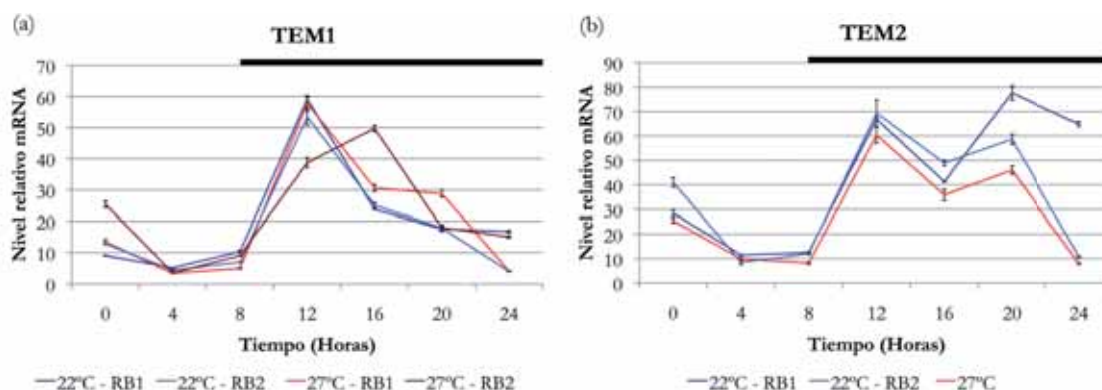
Nivel de mRNA a lo largo de 24 h de los genes (a) *CO* y (b) *FT*, en plantas silvestres Col-0 de 2 semanas cultivadas en condiciones de SD a 22°C (azul) y 27°C(rojo). La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

## 1. EFECTO DE LA TEMPERATURA ALTA SOBRE *TEM*

### 1.1 Regulación temporal y espacial de los niveles de *TEM*

Hemos analizado la expresión a lo largo de 24 horas y a lo largo del desarrollo de *TEM1* y *TEM2* en plantas silvestres cultivadas en condiciones de fotoperiodo desfavorable de SD a 22°C y 27°C. En condiciones de alta temperatura esperaríamos una reducción en los niveles de *TEM* correlacionada con el adelanto del tiempo de floración de las plantas cultivadas a 27°C.

Los primeros experimentos de expresión a lo largo de 24 horas los realizamos en condiciones de cultivo *in vitro*, en placas con medio MS1, en plantas de 2 semanas (Fig. 75). Los niveles de mRNA de *TEM1* y de *TEM2* en las plantas cultivadas en SD a 22°C presentan un pico a ZT12 en ambos casos, para los dos experimentos independientes mostrados, y *TEM2* además muestra otro pico al final de la noche (ZT20-24). Cuando estudiamos la expresión de estos genes en plantas cultivadas en SD a 27°C, no observamos cambios en sus niveles de expresión respecto a los obtenidos a 22°C.



**Figura 75. Niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* a 22°C y 27°C en SD**

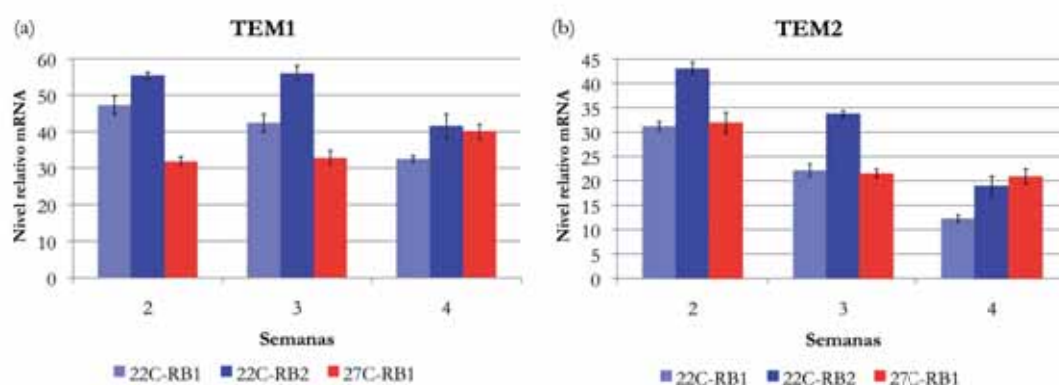
Nivel de mRNA a lo largo de 24 h de los genes (a) *TEM1* y (b) *TEM2*, en plantas silvestres Col-0 de 2 semanas cultivadas en condiciones de SD a 22°C (azul) y 27°C (rojo). La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes (RB1 y RB2) realizados a 22°C o a 27°C (excepto para *TEM2*, donde falta analizar la 2ª réplica biológica). La barra negra superior indica el periodo nocturno.

Sin embargo, al repetir el experimento en condiciones de cultivo en tierra (eliminando así el efecto de la sacarosa de las placas MS1), sí observamos algunas diferencias de expresión entre las plantas cultivadas a 27°C y 22°C (Fig. 76). En estas condiciones, al cuantificar la expresión de *TEM1* y *TEM2* a lo largo del desarrollo podemos observar que *TEM1* parece presentar unos niveles de mRNA más bajos a 27°C que a 22°C, durante las semanas 2 y 3, igualándose los



valores en la semana 4. Por su parte, el mRNA de *TEM2* no muestra cambios significativos a 27°C respecto a 22°C; debido a la variabilidad entre los experimentos realizados a 22°C, la diferencia promedio no fue significativa.

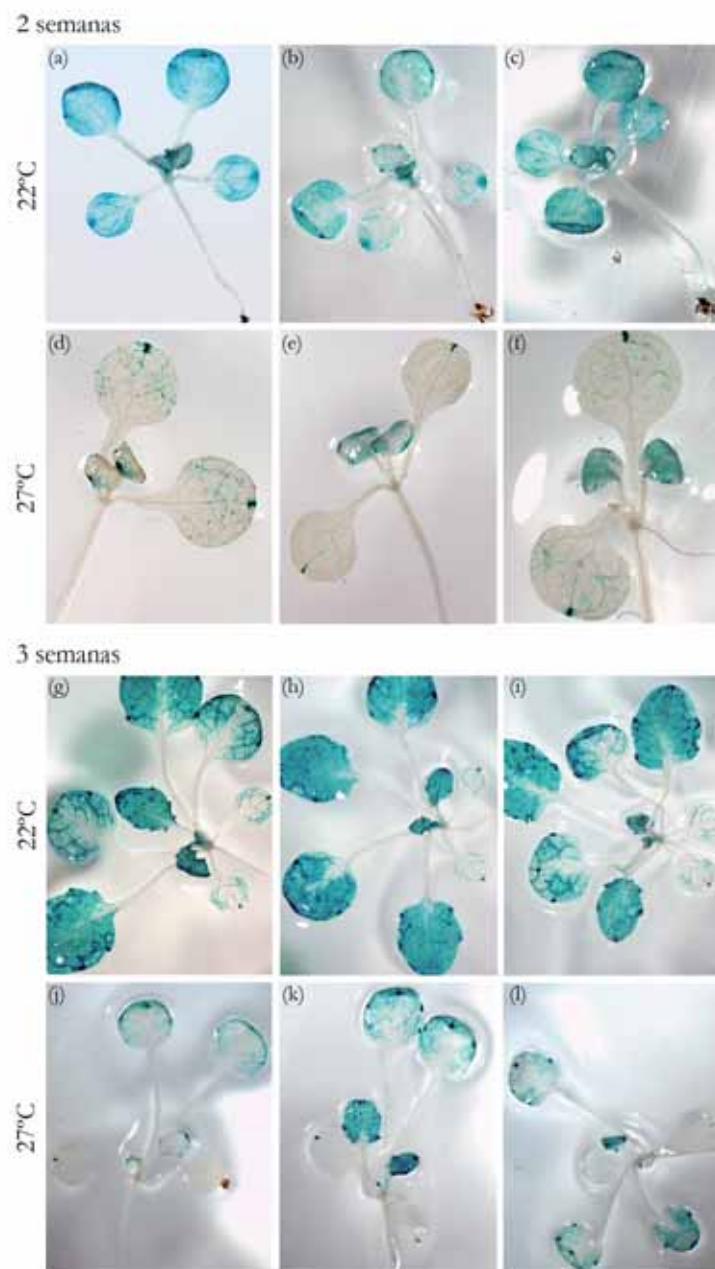
En conjunto estos resultados nos indican que una alta temperatura ambiental no parece afectar a la expresión de *TEM2* pero sí a la de *TEM1*, reduciendo su expresión y, además, que ésta también podría depender del efecto de otros factores como el azúcar.



**Figura 76. Niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* a lo largo del desarrollo a 22°C y 27°C en SD**

Nivel de mRNA a lo largo del desarrollo de los genes (a) *TEM1* y (b) *TEM2*, en las semanas 2, 3 y 4 a ZT12, en plantas silvestres Col-0 cultivadas en condiciones de SD a 22°C (azul) y 27°C (rojo). La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Se muestran dos experimentos independientes (RB1 y RB2) realizados a 22°C y uno (RB1) a 27°C.

Para confirmar el efecto de las altas temperaturas sobre *TEM1*, cultivamos plantas *pTEM1::GUS* a 22°C y 27°C durante 3 semanas en tierra (en las mismas condiciones en las que realizamos los experimentos de expresión mostrados en la figura 76). Se realizó una tinción histoquímica GUS para detectar la expresión de *TEM1* a 22°C a 2 semanas (Fig. 77a-c) y a 3 semanas (Fig. 77g-i) y a 27°C, a dos semanas (Fig. 77d-f) y a 3 semanas (Fig. 77j-l). Los resultados indican que la expresión de *GUS* en plantas *pTEM1::GUS* cultivadas a 27°C está reducida respecto a la que muestran las plantas cultivadas a 22°C durante el período analizado. La expresión de *pTEM1::GUS* a 22°C se localiza en el mesófilo y las venas secundarias de hojas y cotiledones, con una expresión más intensa en las hojas jóvenes (la expresión en las adultas va decreciendo con la edad de la planta) y en los hidatodos. En cambio, en condiciones de 27°C las plantas muestran una expresión claramente más reducida y tenue, concentrada en los hidatodos y bordes distales de las hojas. Esta reducción visible mediante la detección de GUS coincide con los datos de expresión de *TEM1* obtenidos mediante cuantificación por RT-qPCR (Fig. 76). Por lo tanto, la expresión de *TEM1* es menor a 27°C que a 22°C, lo que indica que las temperaturas altas reprimen a este gen.

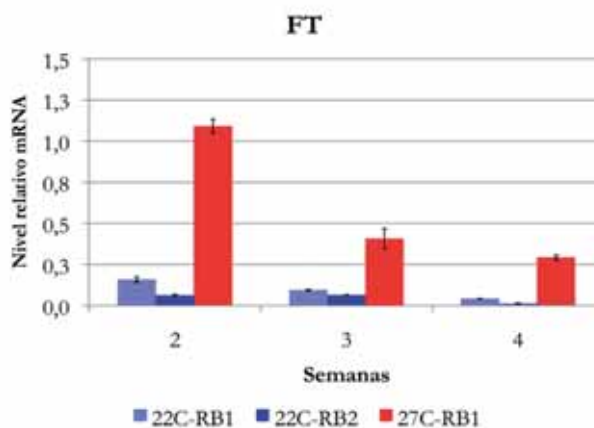


**Figura 77. Ensayo de tinción histoquímica de GUS en plantas  $pTEM1::GUS$  a 22°C y 27°C**  
 Patrón de expresión de *GUS* detectado mediante tinción histoquímica GUS, en plantas con promotor de *TEM1* fusionado al gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*). Se muestra la expresión a 2 semanas (a-f) de plantas cultivadas a 22°C (a-c) y a 27°C (d-f); y a 3 semanas (g-l) de plantas cultivadas a 22°C (g-i) y a 27°C (j-l). Se muestran 3 réplicas biológicas para cada condición experimental.

## 1.2. Regulación temporal de *FT*

Para poder correlacionar, aunque de forma indirecta, la floración temprana de las plantas cultivadas a 27°C con la baja expresión de *TEM1* observada durante las semanas 2 y 3, analizamos la expresión de *FT* en estas mismas condiciones (Fig. 78). Si *TEM1* presenta unos valores bajos de expresión durante las primeras semanas del desarrollo (semanas 2 y 3), es de esperar que *FT* presente unos valores altos a 27°C (debido a una inducción independiente de CO)

en etapas prematuras. La cuantificación del mRNA de *FT* en las mismas plantas donde se han cuantificado *TEM1* y *TEM2*, indica que *FT* se induce a 27°C, coincidiendo con valores bajos de *TEM1*. Es decir, la expresión de *TEM1* y *FT* es inversa, lo que sugiere que también a 27°C es necesaria una baja expresión de *TEM1* que permita la inducción de *FT*.

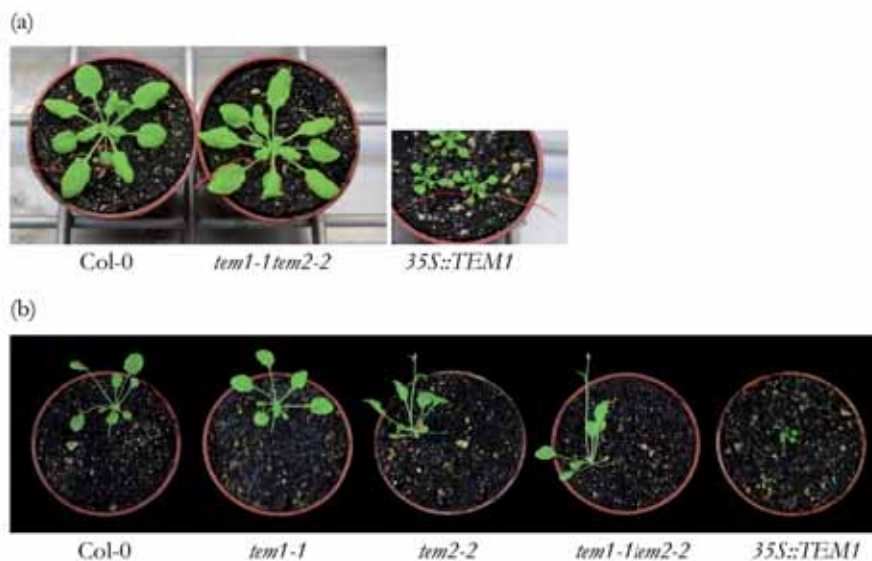


**Figura 78. Niveles de mRNA de *FT* a lo largo del desarrollo a 22°C y 27°C**

Nivel de mRNA de *FT* a lo largo del desarrollo de analizada en las semanas 2, 3 y 4, a ZT12, en plantas silvestres Col-0 cultivadas en condiciones de SD a 22°C (azul) y 27°C (rojo). La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. Se muestran dos experimentos independientes (RB1 y RB2) realizados a 22°C y uno a 27°C.

## 2. EFECTO DE *TEM1* Y *TEM2* EN LA FLORACIÓN

Como ya sabemos, las plantas silvestres Col-0 cultivadas a 27°C producen menos hojas antes de florecer que a 22°C. Debido a que las temperaturas altas reducen la expresión de *TEM1*, analizamos el efecto de los genes *TEM* en el tiempo de floración a 27°C. Fijándonos en los fenotipos, antes de entrar a analizar de forma cuantitativa el tiempo de floración, vemos que en condiciones de cultivo de SD a 22°C ni las plantas silvestres Col-0 ni los mutantes *tem1* y *tem2* han florecido a 28 días (Fig. 79a) Sin embargo, los mutantes *tem1*, *tem2* y *tem1 tem2*, ya lo han hecho el día 26 en SD a 27°C, y florecen antes que las plantas silvestres Col-0 (Fig. 79b). Tampoco se adelanta la floración de las plantas *35S::TEM1* cultivadas a 27°C respecto a las mismas plantas cultivadas a 22°C, ya que en ninguno de los dos casos florecen antes de los 3 meses después del inicio del experimento.



**Figura 79. Fenotipo de floración de mutantes *tem* y *35S::TEM1* a 22°C y 27°C**

Fenotipo de floración en condiciones de (a) SD a 22°C después de 28 días de la siembra y (b) SD a 27°C después de 26 días de la siembra, de las plantas Col-0, *tem1*, *tem2*, *tem1 tem2* y *35S::TEM1*.

La cuantificación del tiempo de floración a 27°C (Tabla 26) indica que el doble mutante *tem1 tem2* es el primero en florecer (con aproximadamente 6,8 hojas totales y alrededor de 16,6 días), seguido de los mutantes sencillos *tem1* y *tem2*, que florecen esencialmente con el mismo número de hojas de roseta (entre 6 y 8, aproximadamente). Estos números son considerablemente más bajos que el de los mismos genotipos cultivados en SD a 22°C (datos presentados en la Tabla 5, capítulo 1 - miRNA). A 22°C observamos que, a pesar de ser tempranos, los mutantes *tem* florecen más tarde que a 27°C. Es decir, sienten el incremento de la temperatura y adelantan la floración. Por su parte, las plantas silvestres Col-0 florecen con aproximadamente 29,7 hojas totales, mientras que a 22°C producen entre 60 y 70 hojas totales, e invierten un elevado número de días en florecer en nuestras condiciones experimentales, prácticamente el mismo número de días que en condiciones de SD a 22°C (entre 8 y 9 semanas).

Estos datos indican que los mutantes *tem* son sensibles a la temperatura alta (como ocurría en el caso de bajas temperaturas de 16°C), ya que florecen antes que las plantas silvestres a 27°C, y además sugieren que podrían estar des-regulando a otros factores inductores de la floración y sensibles a la temperatura, ya que las plantas *tem1 tem2* en SD a 27°C florecen incluso antes que las mismas plantas cultivadas en condiciones de LD a 22°C (Tablas 13 y 15).

<b>27°C</b>		<b>Tiempo de floración (Hojas ± aSD )</b>			<b>Tiempo de floración (Días ± SD )</b>		
<b>Genotipo</b>	<b>Roseta</b>	<b>Caulinares</b>	<b>Totales</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Días</b>	<b>Semanas</b>	<b>Fenotipo</b>
<b>Experimento 1</b>							
Col-0	26,9 ± 4,3	4,9 ± 0,8	31,7 ± 4,9	WT	64,0 ± 3,1	8-9	WT
<i>tem1-1</i>	6,8 ± 0,8	1,9 ± 0,6	8,7 ± 1,0	Temprano	28,5 ± 1,4	4-5	Temprano
<i>tem2-2</i>	6,8 ± 0,9	2,6 ± 0,6	9,4 ± 1,0	Temprano	20,7 ± 1,5	3-4	Temprano
<i>tem1-1 tem2-2</i>	4,7 ± 0,7	2,0 ± 0,4	6,7 ± 0,6	Temprano	16,8 ± 0,7	2-3	Temprano
<b>Experimento 2</b>							
Col-0	27,7 ± 5,3	3,7 ± 1,6	31,5 ± 6,7	WT	64,1 ± 5,9	8-9	WT
<i>tem1-1</i>	6,8 ± 0,7	2,1 ± 0,5	9,0 ± 0,8	Temprano	26,7 ± 1,7	3-4	Temprano
<i>tem2-2</i>	8,7 ± 0,9	2,8 ± 0,7	11,5 ± 0,8	Temprano	25,0 ± 2,0	3-4	Temprano
<i>tem1-1 tem2-2</i>	4,5 ± 0,8	2,1 ± 0,4	6,6 ± 0,9	Temprano	16,1 ± 1,0	2-3	Temprano
<b>Experimento 3</b>							
Col-0	23,1 ± 3,2	2,7 ± 0,9	25,9 ± 3,0	WT	62,9 ± 3,8	8-9	WT
<i>tem1-1</i>	6,4 ± 1,0	2,2 ± 0,5	8,6 ± 1,2	Temprano	25,4 ± 1,7	3-4	Temprano
<i>tem2-2</i>	6,7 ± 0,8	2,8 ± 0,5	9,5 ± 0,9	Temprano	22,3 ± 1,4	3-4	Temprano
<i>tem1-1 tem2-2</i>	4,6 ± 0,7	2,3 ± 0,5	6,9 ± 0,7	Temprano	16,9 ± 0,6	2-3	Temprano
<b>22°C</b>							
<b>Experimento 1</b>							
Col-0	55,7 ± 3,8	8,9 ± 1,0	64,6 ± 4,1	WT	62,4 ± 2,1	8-9	WT
<i>tem1-1 tem2-2</i>	15,3 ± 3,4	3,5 ± 0,8	18,8 ± 3,7	Temprano	29,8 ± 3,9	4-5	Temprano
<b>Experimento 2</b>							
Col-0	62,2 ± 4,1	8,7 ± 0,5	70,9 ± 4,0	WT	66,7 ± 1,9	9-10	WT
<i>tem1-1</i>	54,5 ± 5,2	7,4 ± 1,1	61,9 ± 4,6	Temprano	63,0 ± 3,8	9	Temprano
<i>tem1-1 tem2-2</i>	25,5 ± 5,1	4,1 ± 1,1	29,6 ± 6,0	Temprano	37,3 ± 2,8	5-6	Temprano
<b>Experimento 3</b>							
Col-0	63,7 ± 2,7	9,7 ± 1,0	73,4 ± 3,0	WT	69,5 ± 2,1	9-10	WT
<i>tem1-1</i>	55,5 ± 5,2	6,2 ± 1,6	61,8 ± 6,4	Temprano	58,1 ± 3,0	8-9	Temprano
<i>tem2-2</i>	46,9 ± 3,6	8,2 ± 1,2	55,1 ± 4,4	Temprano	52,6 ± 3,0	7-8	Temprano
<i>tem1-1 tem2-2</i>	32,9 ± 5,5	3,6 ± 0,5	36,5 ± 5,6	Temprano	41,7 ± 4,4	5-6	Temprano
<b>Experimento 4</b>							
Col-0	57,1 ± 4,2	8,9 ± 0,9	66,0 ± 4,4	WT	64,9 ± 1,0	9-10	WT
<i>tem1-1</i>	51,7 ± 4,6	5,0 ± 0,8	56,7 ± 5,3	Temprano	55,7 ± 4,2	7-8	Temprano
<i>tem2-2</i>	33,2 ± 4,0	8,2 ± 0,9	41,4 ± 4,0	Temprano	50,0 ± 2,3	7-8	Temprano
<i>tem1-1 tem2-2</i>	26,4 ± 3,5	4,6 ± 0,5	31,0 ± 3,6	Temprano	38,1 ± 2,1	5-6	Temprano

**Tabla 26. Tiempo de floración de los mutantes *tem1*, *tem2* y *tem1 tem2* a 22°C y 27°C en SD**

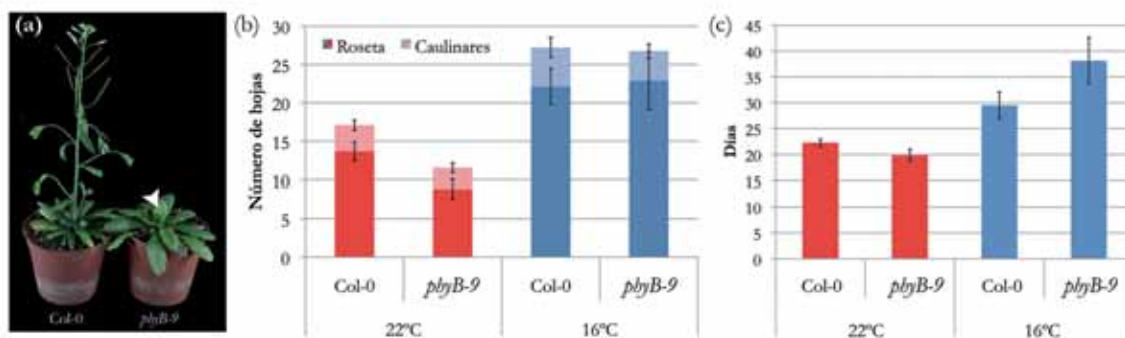
Roseta: Número de hojas de roseta. Caulinares: Número de hojas caulinares. Totales: Número de hojas totales. Días: Días transcurridos desde la siembra hasta que es visible el botón floral a simple vista. SD: Desviación estándar. Se han analizado entre 7 y 20 plantas por genotipo y experimento. El anexo-Tabla 26 muestra el análisis estadístico (ANOVA 1-vía y test de comparaciones múltiples de Bonferroni) y la significación estadística obtenida en las distintas comparaciones entre genotipos y condiciones experimentales.

### III. INTEGRACIÓN DE LAS RUTAS DE LA LUZ Y LA TEMPERATURA

#### 1. REGULACIÓN DE *TEM* EN PLANTAS MUTANTES *phyB* CULTIVADAS A 16°C

Sabiendo que los genes *TEM* están implicados en respuestas a la luz y la temperatura, y basándonos en los estudios previos sobre la regulación de la floración por la temperatura en los mutantes *phyB* (Halliday et al., 2003) nos pareció interesante unir ambas vías y estudiar la transcripción de *TEM* a bajas y altas temperaturas ambientales en diversos mutantes afectados en las respuestas a la luz.

Los mutantes *phyB* pierden el fenotipo de floración temprana cuando crecen en condiciones de bajas temperaturas ambientales de 16°C en LD o SD (Fig. 80) debido a la reducción en los niveles de mRNA de *FT* (Halliday et al., 2003).



**Figura 80. Fenotipos de floración del mutante *phyB* en LD a 22°C y 16°C**

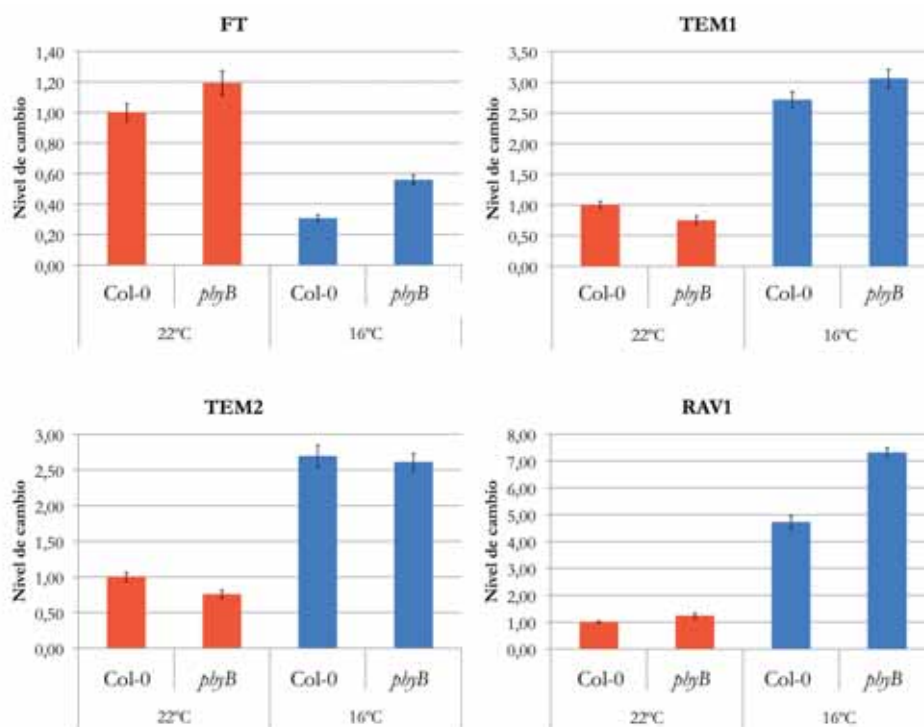
(a) Fenotipo de floración de Col-0 y del mutante *phyB-9* cultivados en LD a 16°C. La punta de flecha señala la incipiente flor producida en el mutante, días después de que la planta control haya florecido. (b-c) Tiempo de floración de plantas silvestres Col-0 y mutantes *phyB-9* cultivadas en LD a 22°C (rojo) o 16°C (azul).

Así, a 16°C *phyB* produce aproximadamente el mismo número de hojas que las plantas silvestres cultivadas en esas mismas condiciones y también florece significativamente más tarde que a 22°C en relación al número de días. La pérdida del fenotipo de floración temprana nos indica que las plantas deficientes en *phyB* perciben la baja temperatura y responden a ella retrasando su floración, igual que lo hacen las plantas silvestres.

En las plantas *phyB* cultivadas a 22°C el nivel de *FT* es mayor que en las plantas control cultivadas a 22°C, mientras que la baja temperatura, 16°C, actúa reduciendo su nivel de mRNA en *phyB* y en el tipo silvestre. Los niveles de expresión de *TEM* en plantas *phyB* cultivadas a 22°C o a 16°C en condiciones de LD sugieren que podría existir una implicación de los *TEM* en el control de la floración en estas condiciones (Fig. 81). De esta manera, el descenso de temperatura a 16°C parece compensar la disminución en la expresión de *TEM1* y *TEM2* que observábamos en las plantas *phyB* a 22°C. Comparando los niveles de ambos *TEM* en plantas Col-0 y *phyB* cultivadas a 16°C podemos ver que los mutantes muestran valores silvestres (más altos a 16°C que a 22°C), lo

que podría explicar el fenotipo de retraso de la floración que presenta *phyB* a 16°C. Esto sugiere que TEM podría integrar la información de ambas rutas para controlar la floración.

En el caso de RAV1, los niveles en el mutante *phyB* incrementan ligeramente, como ya habíamos visto anteriormente; parece que la temperatura baja se sumaría a este efecto, por lo que a 16°C, los mutantes *phyB* presentan unos niveles considerablemente más altos de RAV1 que las plantas silvestres cultivadas en las mismas condiciones.



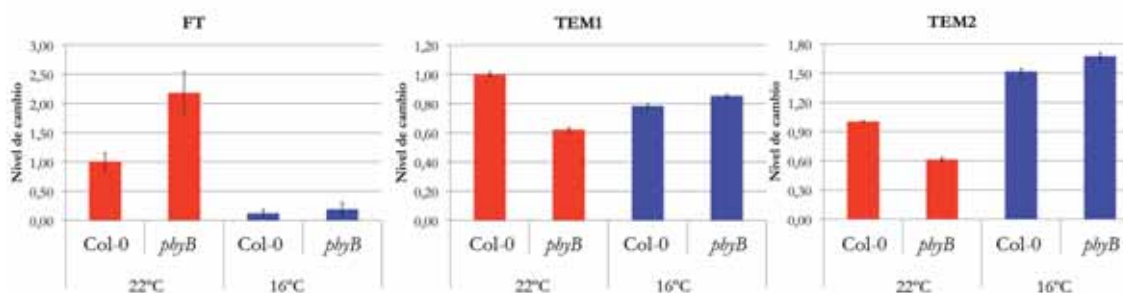
**Figura 81. Niveles de mRNA de *FT*, *TEM* y *RAV* en plantas silvestres y *phyB* en LD a 22°C y 16°C**

Análisis de los niveles de mRNA de *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en plantas Col-0 y *phyB-9* cultivadas en LD a 22°C o 16°C y recogidas a ZT18. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. El gen de referencia utilizado es la Ubiquitina 10. Los valores se han representado en referencia al valor de Col-0 a 22°C. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas.

La repetición de este experimento en fotoperiodo no inductivo a 22°C y 16°C ha reportado resultados similares aunque no idénticos (Fig. 82). En estas condiciones de SD, el déficit de *phyB* tampoco es suficiente para incrementar los niveles de mRNA de *FT* a 16°C lo suficiente para adelantar la floración. Los niveles de *FT* son muy bajos tanto en las plantas silvestres como en *phyB*. Por su parte, *TEM1* presenta valores más altos en las plantas *phyB* cultivadas a 16°C que en las mismas plantas cultivadas a 22°C, igual que veíamos en condiciones de LD (Fig. 81). Sin embargo, parece que el efecto de la temperatura en fotoperiodo desfavorable no es tan importante como en condiciones de LD, ya que los valores de *TEM1* obtenidos en plantas Col-0 a 22°C y 16°C son muy similares. Es decir, parece que el efecto de la baja temperatura sobre *TEM1* podría ser dependiente del fotoperiodo en plantas silvestres. Por último, los resultados de cuantificación de los niveles de *TEM2* muestran la misma tendencia que en condiciones de



fotoperiodo favorable (Fig. 81), lo que sugiere que su regulación por la temperatura podía ser independiente del fotoperiodo.



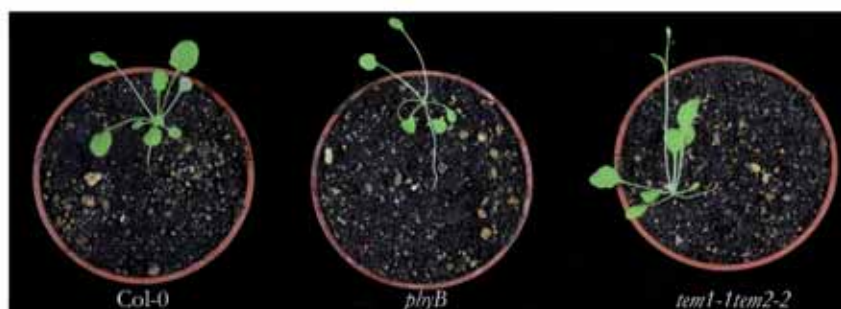
**Figura 82. Niveles de mRNA de *FT*, *TEM1* y *TEM2* en plantas silvestres y *phyB* en SD a 22°C y 16°C**

Análisis de los niveles de mRNA de *FT*, *TEM1* y *TEM2* en plantas Col-0 y *phyB-9* cultivadas en SD a 22°C o 16°C y recogidas a 2 semanas a ZT18. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. El gen de referencia utilizado es la Ubiquitina 10. Los valores se han representado en referencia al valor de Col-0 a 22°C. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 replicas técnicas.

## 2. RELACIÓN DE *phyB* y TEM A ALTAS TEMPERATURAS (SD y 27°C)

Para continuar el estudio de la función de TEM1 y TEM2 en la integración de las rutas de la luz y la temperatura, realizamos experimentos con los mutantes *phyB* y *tem1 tem2* en condiciones de alta temperatura y fotoperiodo desfavorable (SD a 27°C).

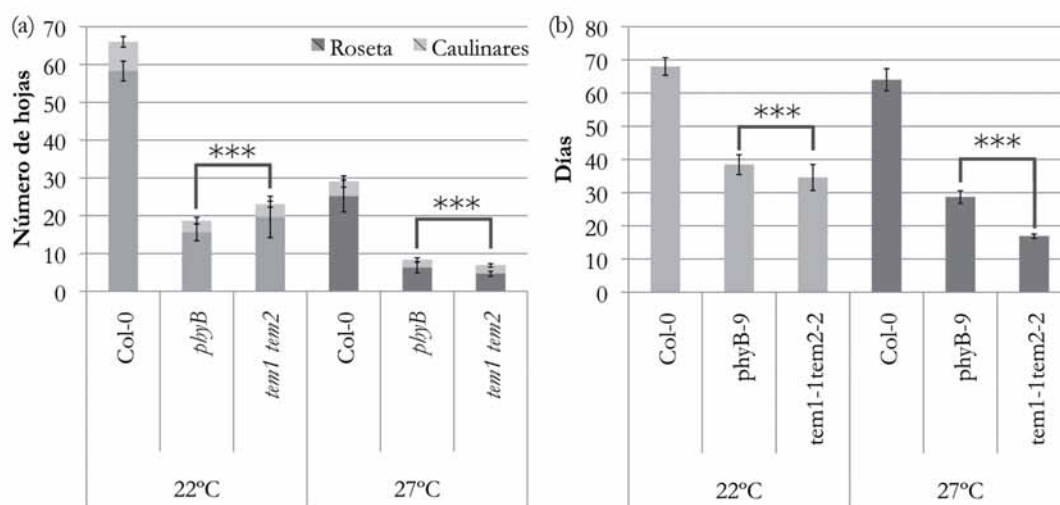
El fenotipo de las plantas cultivadas a altas temperaturas es muy similar al de las plantas que crecen en condiciones de sombra ( $R < FR$ ). Las plantas silvestres Col-0 cultivadas a 27°C tienen un hipocotilo y pecíolos más largos que cuando crecen a 22°C (Gray et al., 1998); el mutante *phyB* muestra una respuesta mucho más acentuada a las altas temperaturas, con un fenotipo de arquitectura de la planta similar al de las plantas sobre-expresantes de *PIF4* cultivadas a altas temperaturas (Koini et al., 2009). Como veríamos anteriormente, el doble mutante *tem1 tem2* florece con un reducido número de hojas y muestra otros fenotipos relacionados con la respuesta a la sombra cuando se cultiva a altas temperaturas (Fig. 83).



**Figura 83. Fenotipo de plantas cultivadas en SD a 27°C durante 26 días**



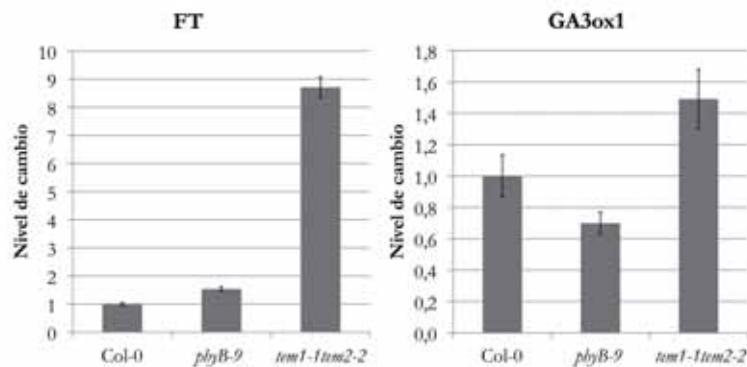
Respecto a las diferencias en el tiempo de floración entre los mutantes a ambas temperaturas (Fig. 84), las plantas *tem1 tem2* florecen con un número de hojas ligeramente superior al de las plantas *phyB* en condiciones de SD a 22°C (23 frente a 18,7 hojas totales en promedio, siendo la diferencia estadísticamente significativa) pero lo hacen con menos hojas cuando crecen a 27°C (6,8 frente a 8,3 hojas totales en promedio, siendo la diferencia estadísticamente significativa). En cuanto al tiempo de floración medido como el número de días que tarda en verse el botón floral, el doble mutante *tem1 tem2* es el que florece en menos días en ambas temperaturas, con un promedio de 16,9 días en SD a 27°C.



**Figura 84. Tiempo de floración de *phyB* y *tem1tem2* en SD a 22°C y 27°C**

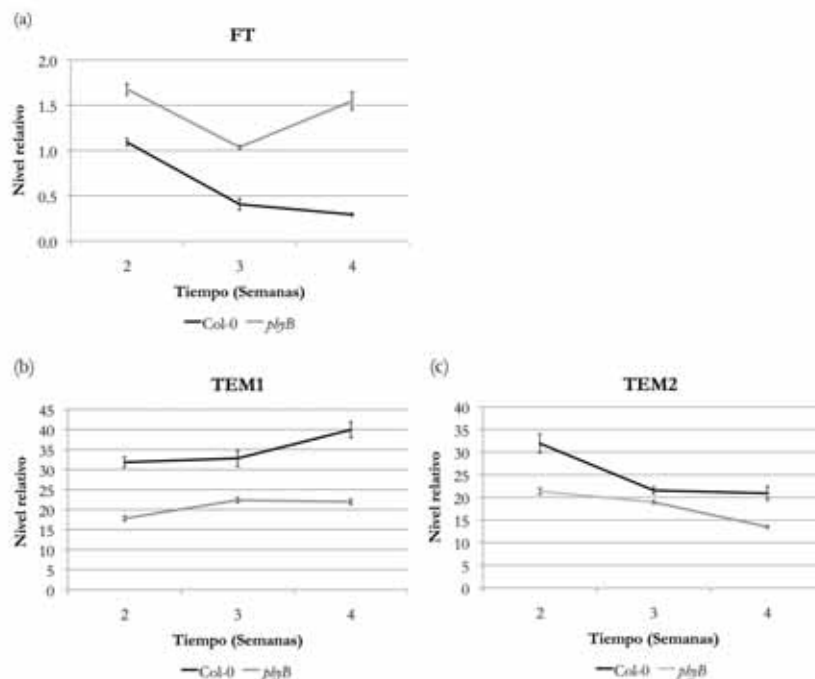
(a) Se muestra el número de hojas de roseta y el de hojas caulinares, y (b) el número de días que tarda en verse el botón floral a simple vista. Se muestra el promedio de dos experimentos. Las barras de error representan la desviación estándar de las muestras biológicas. El número de plantas analizadas en cada experimento varía entre 9 y 20 por genotipo/experimento. Se indica únicamente la significación estadística entre los mutantes *phyB* y el doble *tem1 tem2*. (Test *t*-Student) \*\*\* $p < 0,001$ .

Relacionando estos datos de tiempo de floración con los niveles de *FT*, vemos que estos están considerablemente incrementados en las plantas *tem1 tem2* cuando se cultivan a 27°C, en las que también se produce un incremento del mRNA de *GA3ox1*; ambos cambios son mucho mayores que los que se producen en las plantas *phyB*, lo que explicaría que el doble mutante sean más temprano que *phyB* a 27°C (Fig. 85).



**Figura 85. Niveles de mRNA de FT y GA3ox1 en phyB y tem1 tem2 en SD a 27°C**  
 Análisis de los niveles de transcrito de FT y GA3ox1 en plantas silvestres Col-0 y en el doble mutante tem1 tem2 cultivadas en tierra en SD a 27°C durante 16 días. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

Al estudiar la expresión de TEM a lo largo del desarrollo en plantas WT y phyB cultivadas a 27°C observamos que los niveles de TEM1 y de TEM2 están reducidos en el mutante, como ocurre a 22°C, y esto se correlaciona con el incremento en los niveles de FT (Fig. 86). Esta desrepresión de FT, junto con la activación por parte de CO, en los mutantes phyB, provoca el adelanto de la floración.



**Figura 86. Niveles de mRNA de FT, TEM1 y TEM2 en phyB a lo largo del desarrollo en SD a 27°C**

Análisis de los niveles de mRNA de (a) FT, (b) TEM1 y (c) TEM2 en plantas silvestres Col-0 (gris oscuro) y mutantes phyB-9 (gris claro) cultivadas en tierra en SD a 27°C durante los tiempos indicados. De acuerdo con los datos de floración que teníamos, phyB florece alrededor de unos 28-30 días, con lo que la última muestra está recogida aproximadamente cuando el botón floral es visible a simple vista. El análisis se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. El gen de referencia utilizado ha sido Ubiquitina 10.

## DISCUSIÓN

### I. LOS GENES *TEM* ESTÁN REGULADOS POR LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA LUZ

El déficit o inactivación de *phyB* en plantas mutantes o plantas silvestres que crecen en condiciones de sombra prolongada desencadena una cascada de cambios en multitud de moléculas al encontrarse *phyB*, junto con los otros fotorreceptores, entre las primeras moléculas en reaccionar a la exposición a la luz. Dos de las respuestas mejor estudiadas en estas condiciones son la elongación del hipocotilo y el adelanto de la floración.

#### 1. *phyB* REGULA POSITIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE *TEM1* Y AMBOS CONTROLAN LA FLORACIÓN DE MANERA PARCIALMENTE INDEPENDIENTE

La reducción de los niveles de *TEM1* en plantas *phyB*, cultivadas en LD y SD (Fig. 37 y 38), confirma que éste está regulado por la cascada de señalización de la luz, independientemente del fotoperiodo. A pesar de que el cambio detectado para *TEM1* en *phyB* está comprendido entre el 20% y el 50% respecto a las plantas silvestres, la reproducibilidad de estos resultados nos confirma que el cambio es significativo y sugiere la existencia de otras vías de regulación de la transcripción de *TEM* independientes de *phyB*, como ya hemos ido descubriendo a lo largo de esta tesis.

La reducción de *TEM1* en *phyB* se confirma tanto en su regulación diaria (Fig. 42 y 43) como a lo largo del desarrollo (Fig. 45). La falta de *phyB* parece afectar únicamente a *TEM1* desde el inicio del periodo nocturno y hasta unas horas después de su pico, mientras que la reducción de los niveles de mRNA de *TEM2* se produce principalmente durante el periodo de luz. Sin embargo *phyB* no parece controlar el patrón de expresión espacial de *TEM1*, aunque su expresión se reduce drásticamente en el mesófilo y en los haces vasculares (Fig. 46) en concordancia con la acción de *phyB* en el mesófilo, desde donde regula la floración (Endo et al., 2005). De esta manera, *phyB* podría actuar parcialmente a través de *TEM1* para reprimir a *FT* en las células acompañantes del floema (An et al., 2004).

Las plantas *phyB* mutantes, aunque florecen temprano, lo hacen más tarde en SD que en LD, a pesar de que CO está activo en ambas condiciones (Tablas 12 y 13), sin embargo, las plantas aún tardan entre 2 y 3 semanas en florecer respecto a como lo hacen en LD. Este hecho se puede relacionar con un pico de expresión de *FT* más tardío en SD que en LD (Fig. 44), unos 10 días más tarde. Los niveles de mRNA de *TEM1*, son claramente más bajos en *phyB* que en las plantas silvestres a lo largo de todo el periodo analizado, de manera que la presencia de unos niveles mínimos más temprano podría resultar en la activación prematura de *FT* (Fig. 45). Sin embargo, estos niveles mínimos de expresión se siguen alcanzando más tarde en SD que en LD. Tener a

CO funcional en SD por la falta de *phyB* promueve un adelanto de la floración (Valverde et al., 2004) similar al que obtenemos al quitar a los represores *tem1 tem2* en un fondo con *phyB* activo (Tabla 12). El triple mutante *phyB tem1 tem2* muestra una floración más temprana que los mutantes *phyB* o *tem1 tem2*, tanto en LD como en SD (Tablas 12 y 13). Este fenotipo aditivo indica que *phyB* y *TEM* tienen un efecto parcialmente independiente sobre el control de la floración. El tiempo de floración del triple mutante *phyB tem1 tem2* en LD indica que *TEM* está reprimiendo a otros activadores de la floración, como las enzimas encargadas de la biosíntesis de  $GA_4$  (Osnato et al., 2012). Además, hemos encontrado múltiples sitios de unión posibles para proteínas RAV en el promotor de *PFT1* (no mostrado), el cual está implicado en la ruta de *phyB* (Cerdán & Chory, 2003) y promueve la floración a través de mecanismos dependientes e independientes de CO (Bäckstrom et al., 2007; Iñigo et al., 2012).

Las plantas *phyB tem1 tem2* cultivadas en SD florecen prácticamente a la vez que las plantas Col-0 cultivadas en LD, alrededor de los 20 días, aunque con un menor número de hojas.

En cuanto al papel de los otros fitocromos en la regulación de *TEM*, no podemos concluir que tengan un papel redundante. La ligera reducción de los niveles de *TEM1* en los mutantes *phyD* en SD sugiere cierta regulación por *phyD* (Fig. 39). Esto se correlaciona con que, en estas condiciones, *phyD* florece ligeramente temprano, mientras que en LD no hay efecto sobre el tiempo de floración (Devlin et al., 1999; Halliday & Whitelam, 2003). Los mutantes *phyE* también presentan una floración más temprana en SD que en LD y el doble mutante *phyB phyE* reduce considerablemente el tiempo de floración respecto al mutante *phyB* (Devlin et al., 1998; Halliday & Whitelam, 2003), por lo que sería interesante estudiar los niveles de *TEM* en plantas *phyB phyE*. El doble mutante *phyB phyD* presenta una respuesta más acusada a las condiciones de sombra simulada que el mutante sencillo *phyB*, con pecíolos más alargados (Devlin et al., 1999; Halliday & Whitelam, 2003), lo que sugiere que existe redundancia funcional entre *phyB* y *phyD* para regular las respuestas a la sombra (o calidad de luz), y en menor medida el tiempo de floración, ya que el del doble mutante es similar al de *phyB*. A pesar de no haber cuantificado los parámetros típicos que definen este tipo de respuesta, como la elongación del hipocotilo y la longitud de los pecíolos, sí hemos observado que el doble mutante *phyB tem2* presenta un mayor alargamiento de pecíolos e hipocotilos que el mutante *phyB* (Fig. 47), siendo similar (aunque con un fenotipo menos extremo) al de las plantas que carecen de más de un fitocromo, como las *phyB phyD* o *phyB phyD phyE* (Devlin et al., 1999, 1998; Franklin et al., 2003; Sharrock et al., 2003) o las que sobre-expresan algún PIF, como PIF4 (Kumar et al., 2012) o PIF5 (Fujimori et al., 2004). La falta de los genes *TEM* promueve un incremento en la longitud del hipocotilo, tanto en las plantas *tem1 tem2* como en plantas donde sólo se silencia a estos genes en el SAM (Osnato et al., 2012). Todos estos datos avalan el papel de los genes *TEM* en la respuesta a la calidad de la luz.

Por otro lado, los genes *TEM* también muestran una menor expresión en plantas que crecen en condiciones de luz blanca suplementada con luz roja lejana (sombra simulada) (Fig. 40 y 41), lo que está relacionado con el efecto antagonista de los fitocromos *phyA* y *phyB* (Devlin et al.,

2003). En estas condiciones, el descenso en los niveles de *TEM1* coincide con el obtenido en el mutante *phyB*. Sin embargo, en el caso de *TEM2*, detectamos mayores cambios de expresión que en los mutantes *phyB*, lo que podría sugerir que el fitocromo phyA regula negativamente su expresión. Recordemos que en sombra prolongada se activan las respuestas dependientes de phyA y este fotorreceptor promueve la floración en condiciones de LD (Mockler et al., 2003). Por ello, es probable que la ausencia de cambios de expresión de *TEM2* detectada en los mutantes *phyA* (Fig. 39) se deba a que su acción se desarrolla en LD pero no en SD. Todos estos datos sugieren que la regulación de *TEM1* y *TEM2* por la luz y el fotoperíodo podría ser ligeramente diferente, actuando sobre ellos distintos componentes de la regulación mediada por phyA y phyB. Sería interesante saber si los cambios proteicos son más evidentes que los transcripcionales, y si la regulación de *TEM1* y *TEM2* varía a lo largo del día por efecto de phyA o phyB, como ocurre con la proteína CO (Valverde et al., 2004).

Hemos observado en distintos experimentos que las variaciones de expresión de *RAV1* suelen ser opuestas a las de *TEM1* y *TEM2*. Así, en los mutantes *phyB*, el gen *RAV1* presenta un nivel de expresión mayor que en las plantas silvestres tanto de forma diaria (especialmente durante el período nocturno) como a lo largo del desarrollo (Fig. 42-43 y 45), lo que indica que phyB sería un regulador negativo de la expresión *RAV1*, por lo tanto, jugaría un papel contrario al de los TEM en la regulación de la floración o en las respuestas a la calidad de la luz. De la misma manera, *RAV1* aumenta sus niveles de expresión en los tratamientos de sombra prolongada (Fig. 41) sugiriendo que *RAV1* podría estar inducido por phyA y reprimido por phyB. Sin embargo, no conocemos todavía la función de *RAV1* como para llegar a ninguna conclusión clara.

## **2. EL ADELANTO DE LA FLORACIÓN EN LAS PLANTAS *35S::PIF5* PODRÍA RELACIONARSE CON UN DESCENSO EN LOS NIVELES DE TEM**

Nuestros resultados indican que los PIF no regulan el tiempo de floración en LD o SD a 22°C (Tablas 14 y 15). El adelanto en la floración en las plantas *35S::PIF5* (Fujimori et al., 2004) podría explicarse por el efecto que la sobre-expresión de PIF5 provoca en los niveles de la proteína de phyB. Las plantas *35S::PIF5* reducen considerablemente los niveles proteicos de phyB (Khanna et al., 2007), de manera que se establece un bucle de retroalimentación entre los fitocromos y los PIF (Khanna et al., 2007; Leivar et al., 2012). Esto explicaría los elevados niveles de mRNA de *FT* en las plantas *35S::PIF5* y la reducción en los niveles de *TEM1* y, sobretodo, de *TEM2* (Fig. 49). Sin embargo, ni los mutantes sencillos *pif4*, *pif5* ni el cuádruple *pifQ* se observan cambios en los niveles de *FT* ni tampoco en el tiempo de floración respecto a las plantas silvestres en estas condiciones (Fig. 49 y 51) (Shin et al., 2009).

En condiciones de cultivo en oscuridad y en oscuridad con un pulso de luz roja de 1 hora se observan cambios significativos en la expresión de *TEM2* y *RAV1* (Leivar et al., 2009). En concreto, se ha observado que *TEM2* responde positivamente a la ausencia de PIFs y *RAV1* negativamente, por lo que se los ha clasificado como inducidos (clase 2) y reprimidos (clase 6) por ausencia de PIF, respectivamente (Leivar et al., 2009). Además, PIF5 parece unirse a *TEM2* después de 2 horas en condiciones de R<FR, según experimentos de CHIP-seq (Hornitschek et al., 2012), y se ha descrito un sitio de unión de PIF1, PIF3 y PIF4 que es una G-box modificada, denominada PBE-box (CACATG) (Zhang et al, 2013), la cual está presente en el promotor de *TEM2* (Tabla 16). Todo esto sugiere que PIF5 podría regular a *TEM2* en condiciones de sombra, aunque no podemos saber en qué proceso biológico estarían implicados ya que el tiempo de floración no está afectado.

### **3. VOZ PODRÍA CONTROLAR EL TIEMPO DE FLORACIÓN A TRAVÉS DE TEM1 EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE PHYB EN LD**

Los factores VOZ ofrecen una interesante conexión entre phyB y los genes *TEM*. La reciente publicación de los factores VOZ como inductores indirectos de la floración mediante cambios en *FT* y *FLC* (Celesnik et al., 2013; Yasui et al., 2012) y la detección de la unión de VOZ2 al promotor de *TEM1* en nuestro experimento de híbrido sencillo (Tabla 17) podría relacionar directamente a los represores TEM con la vía de control de la floración por phyB, al actuar como vínculo entre VOZ y *FT*. Es interesante destacar que los cambios de expresión, especialmente en *TEM1*, en el doble mutante *voz1 voz2* respecto a las plantas silvestres, se han obtenido en condiciones de fotoperiodo favorable, en las cuales además, el cambio en el tiempo de floración es significativo para el doble mutante *voz*. Nuestros datos de tiempo de floración de los mutantes *voz* (Tablas 18 y 19) coinciden con los publicados recientemente, en los cuales los mutantes sencillos *voz* no parecen tener afectado el tiempo de floración y únicamente los mutantes dobles cultivados en LD (y no SD) muestran un retraso evidente en la floración (Celesnik et al., 2013; Yasui et al., 2012). Este dato nos plantea una duda sobre la regulación de TEM por VOZ en el control de la floración en condiciones de SD, en las cuales hemos realizado la mayoría de los experimentos relacionados con phyB, lo que sugiere que en condiciones de fotoperiodo desfavorable debe existir otro tipo de regulación adicional que no parece estar mediada por los factores VOZ.

Los niveles de expresión de *TEM1* y *TEM2* en el doble mutante *voz* a lo largo del desarrollo en LD, indican que estos genes están claramente afectados durante las etapas tempranas del desarrollo (Fig. 55, día 12), cuando es importante controlar la acumulación de FT. Una mayor acumulación de los represores *TEM* en los dobles mutantes *voz* inclina la balanza hacia una mayor represión de *FT*, y por lo tanto se retrasa la floración debido a que no permiten una acumulación suficiente de FT alrededor de los 10-12 días de desarrollo. También hemos

observado que el doble mutante *voz1 voz2* parece mostrar una afectación en la velocidad de producción de hojas en LD y SD, ya que crece más lentamente y florece más tarde en días, pero con el mismo número de hojas, que el tipo silvestre (Tablas 18 y 19). Además, parece que los VOZ podrían estar también implicados en la regulación de la transición de la fase juvenil a adulta, ya que el doble mutante *voz* presenta un mayor número de hojas juveniles y adultas (Celesnik et al., 2013). Estas respuestas se correlacionarían con el incremento de expresión de los genes *TEM* en el doble mutante, lo que provocaría el incremento en la producción de hojas y el retraso en las transiciones observados en los mutantes *voz* (Celesnik et al., 2013).

Resultados recientes de doble híbrido obtenidos en nuestro laboratorio indican que las proteínas TEM1 y VOZ1 interactúan (no mostrado). De esta manera, VOZ2 parece controlar los niveles de expresión de *TEM1* al unirse a su promotor, mientras que la proteína TEM1 podría estar regulada por la interacción con VOZ1. El análisis genético del cuádruple mutante *tem1 tem2 voz1 voz2*, que ya tenemos en marcha, confirmará si la regulación de la floración mediada por VOZ es consecuencia directa de la regulación de *TEM1*.

## **II. LOS GENES *TEM* ESTÁN REGULADOS POR LAS BAJAS Y ALTAS TEMPERATURAS AMBIENTALES**

### **1. TEM REGULA LA FLORACIÓN A 22°C Y 16°C DE FORMA PARCIALMENTE DEPENDIENTE A SVP**

Cada vez conocemos mejor la regulación molecular de las respuestas a los cambios moderados en la temperatura. Una ligera disminución de 22°C a 16°C o un ligero incremento de 22°C a 27°C afectan a la expresión del integrador floral *FT*, con independencia del fotoperiodo (Blázquez et al., 2003; Balasubramanian et al., 2006).

En condiciones de baja temperatura (16°C) y día largo, los represores florales ganan importancia al mantener baja la expresión de *FT* a pesar de estar CO presente (Blázquez et al., 2003). Uno de los represores más estudiados en estas condiciones es SVP, en interacción con FLC (Lee et al., 2007). Ambos forman un complejo proteico represor que se une al promotor de *FT* y reduce su expresión en las hojas, a 22°C y 16°C, durante el desarrollo vegetativo (Lee et al., 2007; Li et al., 2008). Además también reprimen a otros dos inductores de la floración, *TSF* y *SOC1* en las hojas y en el SAM, respectivamente (Jang et al., 2009; Lee et al., 2007; Li et al., 2008).

Aunque no hemos detectado un aumento en la expresión de los genes *TEM* a 16°C, a 9 días, ésta decae progresivamente más tarde a lo largo del desarrollo, aproximadamente una semana después, que a 22°C (Fig. 60), lo que explica el retraso de la floración (Tabla 22). En las plantas Col-0 a 12 días, cuando *TEM1* y *TEM2* a 22°C ya han llegado a su mínimo de expresión, estos

aún mantienen niveles altos a 16°C (Fig. 61), que irán cayendo progresivamente hasta las semanas 3-4, retrasando así la floración entre 10 y 15 hojas y 12 y 15 días respecto a 22°C (Tablas 24 y 25).

El efecto de la temperatura sobre *TEM* puede explicarse a través del efecto de regulación positiva y directa que ejerce SVP sobre ellos en LD a 22°C (Tao et al., 2012) y también a 16°C (esta tesis). Al analizar en detalle los promotores de *TEM1* y *TEM2* hemos detectado varios sitios MADS (Fig. 64), de los cuales hemos testado experimentalmente dos regiones para estudiar la unión de SVP a 22°C y 16°C. Nuestros resultados confirman la unión de SVP a *TEM1* y *TEM2* a 22°C (Tao et al., 2012), y aportan nuevos datos sobre la regulación específica de *TEM2* por SVP. En ambas temperaturas, la unión de SVP parece más fuerte a *TEM2* que a *TEM1* (Fig. 65) y más estable a 16°C que a 22°C, lo que se correlaciona con una reducción en los niveles de *TEM2* mayor que los de *TEM1* en las plantas *svp-41*, y con una caída más tardía de los *TEM* a bajas temperaturas en las plantas silvestres (Fig. 60). Además, en los mutantes *svp*, *TEM2* presenta prácticamente los mismos niveles de mRNA a 22°C y 16°C, reducidos en ambos casos respecto al que presentan en las plantas Col-0 (Fig. 66). Esto sugiere que, aunque los genes *TEM* sean redundantes en su función como represores de *FT* y *GA3ox1/2* (Castillejo & Pelaz, 2008; Osnato et al., 2012), podrían tener una mayor especificidad funcional y actuar sobre diferentes genes diana en otras rutas génicas diferentes como, en este caso, en la respuesta a cambios en la temperatura ambiental. La regulación parcial de los *TEM* por SVP es compatible con la hipótesis general que planteamos en esta tesis, según la cual los genes *TEM* integrarían la información de múltiples rutas de control de la floración.

La floración temprana de los mutantes *tem*, a diferencia de la de los mutantes *svp* que es insensible a los cambios de temperatura, responde a las bajas temperaturas y presenta un retraso respecto a *svp* a 16°C, pero no a 22°C (Tablas 24 y 25). Por lo tanto, los genes *TEM* no parecen estar involucrados en el control de la respuesta de la planta a las temperaturas ambientales bajas, si no que transmiten la señal de respuesta a temperaturas bajas al aumentar sus niveles de expresión y retrasar la floración.

El análisis de las combinaciones de los mutantes a diferentes temperaturas, nos indica que *TEM1/TEM2* y SVP actúan en la misma ruta a 22°C, lo que coincide con la reducción de la expresión de ambos *TEM* en los mutantes *svp* (Fig. 66) y los datos de ChIP-qPCR que demuestran la unión directa de SVP a *TEM1* y *TEM2* (Tao et al., 2012). Los datos de floración de los mutantes en estos genes sugieren que el efecto represor de *TEM* sobre *FT* sería mayor que el que ejerce SVP a 22°C (Fig. 72 y 73), aunque los datos de floración apuntan a que la relevancia biológica de este cambio sería mínima, ya que los mutantes *svp* y el doble *tem1 tem2* florecen prácticamente con el mismo número de hojas. Es decir, que en ambos casos se ha superado el umbral de activación de *FT*.

A 16°C, el análisis global de los datos indica que existe un efecto ligeramente aditivo de SVP y *TEM*, lo que sugiere que estos podrían actuar de forma parcialmente independiente. Además, la combinación del triple mutante *svp tem1 tem2* no es mucho más temprana que el mutante *svp*



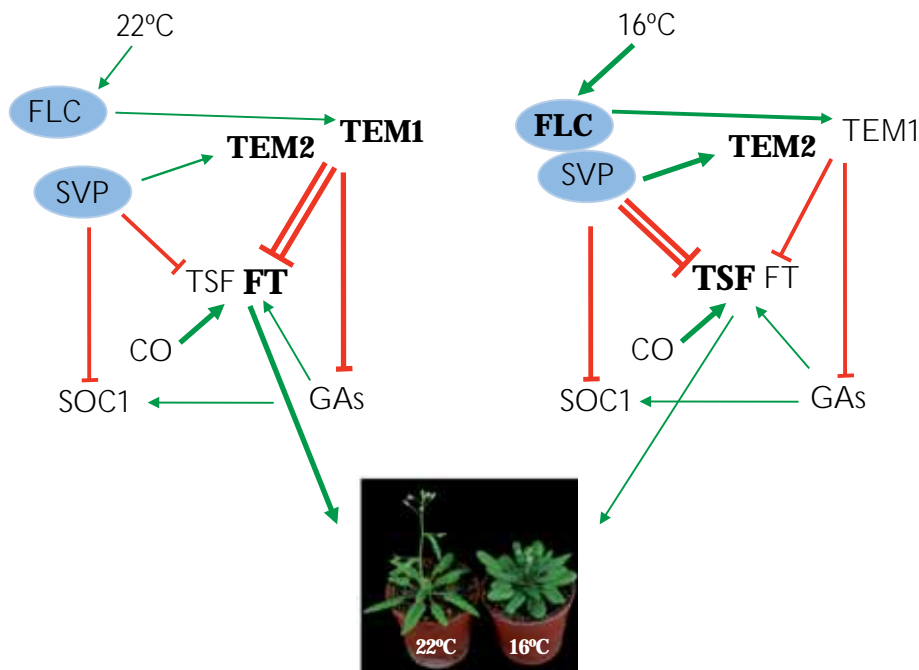
sencillo, lo que sugiere que también actúan en parte en la misma ruta. Por tanto, a 16°C SVP reprime la floración en parte a través de *TEM* (probablemente *TEM2*) y en parte a través de otros genes. Otro de los represores relacionado con SVP es *FLC*, que actúa de forma dependiente a SVP en condiciones de baja temperatura ambiental (16°C) en ecotipos como Col-0 (el cual no requiere de vernalización para florecer) (Lee et al., 2007; Li et al., 2008). El complejo proteico formado por *FLC-SVP* reprime a los genes *FT*, *TSF* y *SOC1* (Jang et al., 2009; Lee et al., 2007; Li et al., 2008).

La baja temperatura provoca un incremento en los niveles de miR156 (Lee et al., 2010). Por tanto, las bajas temperaturas mantienen a las plantas en estado juvenil durante más tiempo (Kim et al., 2012). Teniendo en cuenta el retraso en la caída temporal de *TEM* a 16°C y los resultados obtenidos en el capítulo anterior de regulación de la floración por la edad, sería interesante analizar si la baja temperatura podría afectar a la relación de *TEM* con la ruta de miR156/miR172, que además se ha descrito como parcialmente independiente de SVP (Jung et al., 2012; Kim et al., 2012). De esta manera, los genes *TEM* podrían actuar en dos rutas de respuesta a la baja temperatura, una en la que SVP regula a *TEM2*, y otra en la que los *TEM* inducen a miR156. Además de miR156, también miR172 está relacionado con el control de la floración por la temperatura (Lee et al., 2010). En este caso, SVP regula negativamente la transcripción de los genes *MIR172*, aunque la acumulación de miR172 por regulación de la temperatura ambiental es principalmente independiente de la acción de SVP (Jung et al., 2012). Nuestros resultados también sugieren una ruta paralela a la de SVP, parcialmente independiente, que controla los niveles de miR172 a través de *TEM*, ya que, como hemos visto en el capítulo anterior, los genes *TEM* regulan negativamente los niveles de miR172. De manera que *TEM* podrían controlar de manera directa o indirecta a múltiples inductores de la floración, como los genes *SPL*, *MIR172*, *FT* o *SOC1*, bajo diferentes condiciones de temperatura.

Igual que *FT*, *TSF* también está activado por CO y reprimido por SVP y *FLC*, en LD a 22°C (Jang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2005). *TSF* es parcialmente redundante con *FT* y su efecto es más pronunciado en ausencia de éste (Jang et al., 2009; Yamaguchi et al., 2005; ). Un completo estudio del tiempo de floración a 23°C y 16°C de las diferentes combinaciones de mutantes de todos los genes de la familia de *FT* (Kim et al., 2013) ha permitido establecer que el mutante *tsf-1* tiene reducida la sensibilidad a los cambios en la temperatura ambiental, de manera independiente de *FT*. En los mutantes *syp-41* los niveles de mRNA de ambos genes están incrementados (Jang et al., 2009; Li et al., 2008). Sin embargo, en LD a 16°C, el cambio en la expresión de *FT* en el mutante *syp-32* es muy ligero respecto al de las plantas silvestres (Lee et al., 2007), por lo que otros genes, como *TSF* o *SOC1* parecen estar implicados en la inducción temprana de la floración en estos mutantes a bajas temperaturas ambientales (Kim et al., 2013; Lee et al., 2007, 2012; Strasser et al., 2009).

Como hemos demostrado, los genes *TEM* reprimen la expresión de *FT* y *TSF* a 22°C y 16°C (Fig. 69 a 73). No hemos encontrado posibles sitios de unión de RAV en la secuencia de *TSF* que

sugieran una regulación directa, pero los experimentos de expresión realizados a 16°C muestran un claro incremento en sus niveles de mRNA en las plantas *tem1 tem2* respecto a las plantas Col-0 (Fig. 44). Podemos conjeturar, por tanto, que TEM controlaría la inducción floral a través de *TSF* a 16°C, y en menor medida a través de *FT* (Fig. 69).



**Figura 87. Modelo de la red de regulación de genes implicados en la floración a 22°C y 16°C**  
 El efecto de TEM1 y TEM2 sobre *FT* regularía la floración de manera más eficiente a 22°C que a 16°C. A bajas temperaturas, SVP controla la expresión de *FT* y *TSF* de forma parcialmente independiente a TEM, los cuales actúan en la misma ruta de regulación de SVP a 22°C. La marca en negrita indica mayores niveles de expresión, y el grosor de las flechas o líneas de represión un mayor efecto.

Por otra parte, hemos observado que *RAV1* no responde a una bajada moderada de la temperatura (16°C), aunque está descrito como un gen de respuesta a frío (4°C) por lo que su acción puede estar limitada a esas condiciones (Fowler et al., 2005; Fowler & Thomashow, 2002). De la misma manera, el tiempo de floración del mutante *rav1-1* es muy similar al de las plantas silvestres a 22°C y a 16°C (Tabla 22), por lo que RAV1 no parece regular la floración en estas condiciones. Aunque se ha identificado a RAV1 como un posible gen diana de SVP y AP1 en estadios iniciales del desarrollo floral (Gregis et al, 2013), no hemos detectado cambios de su expresión en plantas *syp* de 9 días respecto a Col-0 ni a 22°C ni a 16°C (resultados no mostrados).

## 2. LAS ALTAS TEMPERATURAS REDUCEN LOS NIVELES DE TEM

En condiciones de alta temperatura ambiental y día corto, *FT* vuelve a ser el principal inductor de la floración. En un fotoperiodo desfavorable, CO no está activo, por lo que no puede inducir la expresión de *FT*. A pesar de ello, se observó que los niveles de mRNA de *FT*

eran altos a 27°C y que la floración se adelantaba independientemente de los niveles de *CO* (Fig. 74) (Balasubramanian et al., 2006). Esta observación apuntaba a la presencia de otro activador en estas condiciones. Muy recientemente se ha descrito que en esta acción inductora está involucrado PIF4, de manera dependiente de la inducción térmica y de la ausencia de la histona H2A.Z (Kumar et al., 2012). En estas condiciones, PIF4 toma el relevo de *CO* y activa a *FT* para adelantar la floración.

A alta temperatura ambiental (27°C), al igual que a bajas temperaturas (16°C), los genes *TEM* no muestran cambios evidentes en su expresión en etapas tempranas del desarrollo respecto a 22°C en plantas cultivadas en placa (Fig. 75). Sin embargo, sí se observan diferencias experimentales en los niveles de expresión de *TEM1* a lo largo del desarrollo entre 22 y 27°C al cultivar las plantas en tierra (Fig. 76). Además, el experimento de tinción histoquímica de GUS de las plantas *pTEM1::GUS* (Fig. 77), esclarece y confirma los datos obtenidos mediante RT-qPCR a lo largo del desarrollo en condiciones de cultivo en tierra. Así, los resultados muestran que se produce una clara reducción en los niveles de expresión de *TEM1* a 27°C que coincidirían con elevados niveles de *FT* (Fig. 78). Por lo tanto, la reducción de *TEM1* a esta temperatura probablemente contribuye al aumento de expresión de *FT* que acelera la floración.

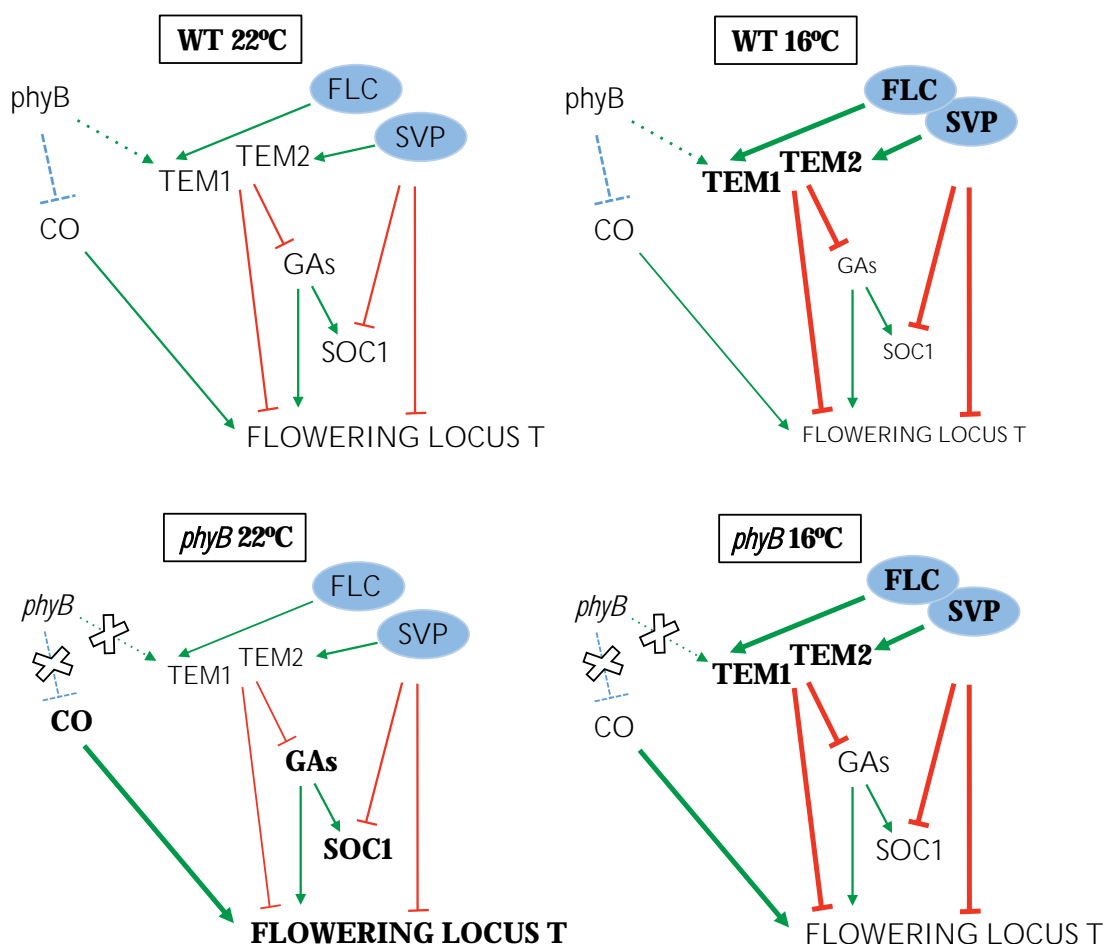
A diferencia de otros genes implicados en la respuesta de la floración a la temperatura, como los genes de la vía autónoma *FVE/FCA* o el represor *FLM*, cuyos mutantes son insensibles a los cambios de temperatura (Balasubramanian et al., 2006), los mutantes sencillos *tem1*, *tem2* y el doble mutante *tem1 tem2* responden al incremento de temperatura y florecen antes a elevadas temperaturas (Tabla 26). Este comportamiento también se ha observado en los mutantes *flc-3*, que también florecen temprano en SD a 27°C respecto a como lo hacen a 23°C (Balasubramanian et al., 2006). Por otra parte, el doble mutante *tem1 tem2* florece incluso antes en SD a 27°C (Tabla 26) que en LD a 22°C (Tabla 24), lo que sugiere que los TEM podrían estar reprimiendo a otros genes implicados en las respuestas a las altas temperaturas, o bien que a la inducción de *FT* en condiciones de alta temperatura se suma el efecto de las giberelinas, que actúan como inductores principales de la floración en SD.

### III. TEM INTEGRA LA INFORMACIÓN DE LAS RUTAS DE LA LUZ Y LA TEMPERATURA

Finalmente, como ejemplo de integración de dos de las rutas más importante en el control de la floración, analizamos la participación de los genes *TEM* en las respuestas a la luz y la temperatura conjuntamente.

Con independencia de la ruta de FLC, las bajas temperaturas alteran el fenotipo del mutante *phyB* atrasando su floración hasta niveles silvestres, lo que se relaciona con una caída en los niveles de *FT* (Halliday et al., 2003). La comparación entre el tiempo de floración de los mutantes *phyB* (Fig. 80) y los niveles de expresión de *TEM* en esas plantas en LD a 22°C y 16°C (Fig. 81) sugiere que el incremento en la expresión de los genes *TEM* en plantas *phyB* a 16°C podría ser responsable del retraso de su floración. Nuestros resultados indican que los genes *TEM* actúan en la vía de la temperatura ambiental de manera parcialmente dependiente de SVP en LD a 16°C (Tabla 25), y además, muestran que *TEM1* actúa por debajo de *phyB* controlando el tiempo de floración también en LD (Fig. 37). El análisis del mutante *phyB* en LD a 16°C apunta a que los genes *TEM* actúan como integradores de las rutas de la luz y las bajas temperaturas, al compensar el efecto de la pérdida del represor floral *phyB* (en los mutantes *phyB*) con un incremento en sus niveles de expresión a bajas temperaturas, lo que finalmente conduce a unos tiempos de floración silvestres (Fig. 88).

Recientemente se ha descrito la acción de PIF4 como activador de *FT* a altas temperaturas (Kumar et al., 2012). En plantas con *phyB* intacto, CO se mantendría inactivo en SD a 22°C, por lo que *FT* no se activa; en cambio, a altas temperaturas de 27°C, la función de activador de *FT* la realiza PIF4. Los genes *TEM* siguen teniendo un papel importante como represores también a esa temperatura, ya que la pérdida funcional de estos genes en el doble mutante *tem1 tem2* provoca una aceleración de la floración a 27°C, mayor que la que se observa en el mutante *phyB* (Fig. 85, Tabla 26), por efecto de un incremento mayor en los niveles de *FT* (Fig. 86). Sería interesante estudiar si los genes *TEM* tienen algún efecto sobre el activador PIF4, ya que hemos comprobado que el gen *HFR1*, regulador negativo de *PIF4* y *PIF5* (Hornitschek et al., 2009; Sessa et al., 2005), contiene en sus secuencias algunos posibles sitios de unión para RAV (datos no mostrados), lo que podría indicar que los *TEM* podrían actuar también sobre los reguladores del activador PIF4 a altas temperaturas.



**Figura 88. Modelo final de la interacción entre las rutas de luz y temperatura en el control de los genes TEMPRANILLO**

En plantas silvestres cultivadas a 22°C, el balance entre CO y TEM determina la activación del inductor floral *FT*. Esta vía directa es más rápida que la de activación mediada por las GAs (a través de los genes de su biosíntesis *GA3ox1/2* los cuales son también genes diana de TEM). En condiciones de baja temperatura (16°C), la represión de *FT* está también controlada a través de los represores FLC y SVP, por lo que su expresión en menor que a 22°C, lo que provoca un retraso de la floración. En plantas mutantes *phyB* cultivadas a 22°C, la des-represión de la proteína CO, y la reducción en los niveles de los represores TEM, provoca un incremento en los valores de *FT*, lo que conlleva un adelanto de la floración. Por último, en plantas *phyB* cultivadas a 16°C, la des-represión de CO comportaría un incremento en los valores de *FT*, como ocurre a 22°C, pero los represores TEM ejercen un papel represor a bajas temperaturas, mediante la activación de SVP y FLC, los cuales también actúan sobre *FT* a esta temperatura para evitar su activación prematura y retrasar la floración. Las flechas indican regulación positiva o activación y las líneas acabadas en barra indican regulación negativa o represión. El grosor de cada una de ellas indica su importancia.

## CONCLUSIONES

1. La reducción de los niveles de *TEM1* en las plantas *phyB*, tanto de forma diaria como a lo largo del desarrollo y cultivadas en LD y SD, indica que éste está regulado por la cascada de señalización de la luz, independientemente del fotoperiodo.
2. El fenotipo aditivo del triple mutante *phyB tem1 tem2* indica que *phyB* y *TEM* tienen un efecto parcialmente independiente sobre el control de la floración.
3. En un fondo mutante *phyB*, a pesar de estar CO presente, la presencia de *TEM1* y *TEM2* provoca un retraso de la floración no sólo en número de hojas, sino también en número de días.
4. El doble mutante *phyB tem2* presenta un fenotipo más acusado de alargamiento de pecíolos e hipocotilos que el mutante sencillo *phyB*.
5. En los mutantes *phyB*, el gen *RAV1* presenta un nivel de expresión mayor que en las plantas silvestres tanto de forma diaria como a lo largo del desarrollo, lo que indica que *phyB* sería un regulador negativo de la expresión de *RAV1*. De la misma manera, *RAV1* aumenta sus niveles de expresión en los tratamientos de sombra prolongada.
6. El incremento en los niveles de mRNA de *FT* en las plantas *35S::PIF5* coincide con un descenso en los niveles de *TEM1* y *TEM2*, sobretodo de éste último, aunque ni el mutante sencillo *pif5* ni el cuádruple *pifQ* muestran cambios en los niveles de *FT* ni en el tiempo de floración respecto a las plantas silvestres. De esta manera, *PIF5* no parece regular el tiempo de floración en LD o SD a 22°C.
7. Los factores *VOZ* podrían conectar a *phyB* y los genes *TEM* para controlar el tiempo de floración en LD a 22°C. La unión de *VOZ2* al promotor de *TEM1*, la interacción proteica entre *VOZ1* y *TEM1* o los niveles de mRNA ligeramente más altos de *TEM1* y *TEM2* en el doble mutante *voz1 voz2*, podrían relacionar directamente a los represores *TEM* con la vía de control de la floración por *phyB*, al actuar como vínculo entre *VOZ* y *FT*.
8. Los niveles de expresión de *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* no incrementan en las etapas tempranas del desarrollo, en condiciones de baja temperatura ambiental (16°C), aunque la expresión de estos genes decae progresivamente más tarde a 16°C que a 22°C, lo que explicaría el retraso de la floración de las plantas Col-0 cultivadas a 16°C.
9. La unión directa de *SVP* a *TEM1* y *TEM2* a 22°C, descrita previamente, también se produce, y es más importante, a 16°C en el caso de *TEM2*. Además, esta unión se correlaciona con los datos de expresión de *TEM1* y *TEM2* obtenidos a ambas temperaturas en las plantas *sip-41*, en las que *TEM2* sufre una caída más significativa que *TEM1* a 16°C.

10. Los genes *TEM* no parecen estar involucrados en el control de la respuesta de la planta a las temperaturas ambientales bajas, si no que transmiten la señal de respuesta a temperaturas bajas al aumentar sus niveles de expresión y retrasar la floración.
11. El análisis de las diferentes combinaciones de mutantes sencillos, dobles y el triple *syp tem1 tem2* nos indica que *TEM1* y *TEM2* actúan en la misma ruta genética que *SVP* para reprimir la floración a 22°C; y que son parcialmente aditivos a 16°C, de manera que *SVP* regula la floración en parte a través de *TEM* y en parte a través de otros genes en condiciones de baja temperatura.
12. El gen *RAV1* no parece estar implicado en la regulación del tiempo de floración en LD a 22°C o 16°C. El mutante sencillo *rav1* no muestra diferencias en el tiempo de floración respecto a las plantas silvestres en estas condiciones. Además, el conjunto de análisis de expresión realizados indican que *TEM* reprime su expresión a 22°C y 16°C, y que su regulación por efecto de la luz y la temperatura es opuesta a la de estos.
13. Los genes *TEM* reprimen la expresión de *FT* y *TSF* a 22°C y 16°C.
14. Las altas temperaturas ambientales provocan una clara reducción en los niveles de expresión de *TEM1* que se correlaciona con elevados niveles de *FT*.
15. El incremento en la expresión de los genes *TEM* en las plantas *phyB* a 16°C podría ser responsable del retraso en su tiempo de floración. El análisis del mutante *phyB* en LD a 16°C sugiere que los genes *TEM* podrían actuar como integradores de las rutas de la luz y la temperatura baja, al compensar el efecto de la pérdida del represor floral *phyB* (en los mutantes *phyB*) con un incremento en sus niveles de expresión, lo que finalmente conduce a unos tiempos de floración silvestres a bajas temperaturas.

**LITERATURA CITADA**

- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., ... Coupland, G. (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development*, *131*(15), 3615–3626.
- Bäckström, S., Elfving, N., Nilsson, R., Wingsle, G., & Björklund, S. (2007). Purification of a plant mediator from Arabidopsis thaliana identifies PFT1 as the Med25 subunit. *Molecular Cell*, *26*(5), 717–729.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., & Weigel, D. (2006). Potent induction of Arabidopsis thaliana flowering by elevated growth temperature. *Plant Genetics*, *2*(7), e106.
- Bauer, D., Viczián, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitsche, R., Kunkel, T., ... Nagy, F. (2004). Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*(6), 1433–1445.
- Blázquez, M. a., & Weigel, D. (1999). Independent regulation of flowering by phytochrome B and gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *120*(4), 1025–1032.
- Blázquez, M. A., Ahn, J. H., & Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, *33*(2), 168–171.
- Brock, M. T., Maloof, J. N., & Weigand, C. (2010). Genes underlying quantitative variation in ecologically important traits: PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4) is associated with variation in internode length, flowering time, and fruit set in Arabidopsis thaliana. *Molecular Ecology*, *19*(6), 1187–1199.
- Casal, J. J. (2012). Shade avoidance. *The Arabidopsis Book*, *10*, e0157.
- Castillejo, C., & Pelaz, S. (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology*, *18*(17), 1338–1343.
- Castillon, A., Shen, H., & Huq, E. (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science*, *12*(11), 514–521.
- Celesnik, H., Ali, G. S., Robison, F. M., & Reddy, A. S. N. (2013). Arabidopsis thaliana VOZ (Vascular plant One-Zinc finger) transcription factors are required for proper regulation of flowering time. *Biology Open*, *2*(4), 424–431.
- Cerdán, P. D., & Chory, J. (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature*, *423*(6942), 881–885.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C. a, Taylor, J. M., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(16), 6680–6685.
- Devlin, Paul F, Patel, S. R., & Whitelam, G. C. (1998). Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *10*, 1479–1487.
- Devlin, Paul F, Robson, P. R. H., Patel, S. R., Goosey, L., Sharrock, R. A., & Whitelam, G. C. (1999). Phytochrome D Acts in the Shade-Avoidance Syndrome in Arabidopsis by Controlling Elongation Growth and Flowering Time. *Plant Physiology*, *119*(3), 909–915.
- Devlin, Paul Francis, Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2003). A Genomic Analysis of the Shade Avoidance Response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *133*, 1617–1629.
- Edwards, K. D., Anderson, P. E., Hall, A., Salathia, N. S., Locke, J. C. ., Lynn, J. R., ... Millar, A. J. (2006). FLOWERING LOCUS C Mediates Natural Variation in the High-Temperature Response of the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant Cell*, *18*, 639–650.
- Endo, M., Nakamura, S., Araki, T., Mochizuki, N., & Nagatani, A. (2005). Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in Arabidopsis vascular bundles. *The Plant Cell*, *17*(7), 1941–1952.
- Fowler, S. G., Cook, D., & Thomashow, M. F. (2005). Low Temperature Induction of Arabidopsis CBF1, 2, and 3 Is Gated by the Circadian Clock. *Plant Physiology*, *137*, 961–968.
- Fowler, S., & Thomashow, M. F. (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell*, *14*, 1675–1690.



- Franklin, K. a. (2009). Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(1), 63–68.
- Franklin, K. a, Praekelt, U., Stoddart, W. M., Billingham, O. E., Halliday, K. J., & Whitelam, G. C. (2003). Phytochromes B, D and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(3), 1340–1346.
- Franklin, K. a, & Quail, P. H. (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 11–24.
- Franklin, K. a, & Whitelam, G. C. (2005). Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of Botany*, 96(2), 169–175.
- Fujimori, T., Yamashino, T., Kato, T., & Mizuno, T. (2004). Circadian-Controlled Basic/Helix-Loop-Helix Factor, PIL6, Implicated in Light-Signal Transduction in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology*, 45(8), 1078–1086.
- Fujiwara, S., Oda, A., Yoshida, R., Niinuma, K., Miyata, K., Tomozoe, Y., ... Mizoguchi, T. (2008). Circadian clock proteins LHY and CCA1 regulate SVP protein accumulation to control flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 20(11), 2960–2971.
- Goosey, L., Palecanda, L., & Sharrock, R. a. (1997). Differential patterns of expression of the Arabidopsis PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiology*, 115(3), 959–969.
- Gray, W. M., Ostin, A., Sandberg, G., Romano, C. P., & Estelle, M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7197–7202.
- Gregis, V., Andrés, F., Sessa, A., Guerra, R. F., Simonini, S., Mateos, J. L., ... Kater, M. M. (2013). Identification of pathways directly regulated by SHORT VEGETATIVE PHASE during vegetative and reproductive development in Arabidopsis. *Genome Biology*, 14(6), R56.
- Halliday, K. J., Salter, M. G., Thingnaes, E., & Whitelam, G. C. (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *The Plant Journal*, 33(5), 875–885.
- Halliday, K. J., & Whitelam, G. C. (2003). Changes in Photoperiod or Temperature Alter the Functional Relationships between Phytochromes and Reveal Roles for phyD and phyE. *Plant Physiology*, 131, 1913–1920.
- Hartmann, U., Hohmann, S., Nettesheim, 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.
- Heggie, L., & Halliday, K. J. (2005). The highs and lows of plant life: temperature and light interactions in development. *The International Journal of Developmental Biology*, 49(5-6), 675–687.
- Hornitschek, P., Kohnen, M. V, Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., López-Vidriero, I., ... Fankhauser, C. (2012). Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *The Plant Journal*, 71(5), 699–711.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., & Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *The EMBO journal*, 28(24), 3893–3902.
- Hudson, M. E., & Quail, P. H. (2003). Identification of Promoter Motifs Involved in the Network of Phytochrome A-Regulated Gene Expression by Combined Analysis of Genomic Sequence and Microarray Data. *Plant Physiology*, 133(4), 1605–1616.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C. H., Apel, M., & Quail, P. H. (2004). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science*, 305(5692), 1937–1941.
- Huq, E., & Quail, P. H. (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 21(10), 2441–2450.
- Iñigo, S., Alvarez, M. J., Strasser, B., Califano, A., & Cerdán, P. D. (2012). PFT1, the MED25 subunit of the plant Mediator complex, promotes flowering through CONSTANS dependent and independent mechanisms in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 69(4), 601–612.

- Jang, I.-C., Henriques, R., Seo, H. S., Nagatani, A., & Chua, N.-H. (2010). Arabidopsis PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *The Plant cell*, *22*(7), 2370–83.
- 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.
- Jin, H. L., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., ... Martin, C. (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, *19*(22), 6150–6161.
- Josse, E.-M., & Halliday, K. J. (2008). Skotomorphogenesis: the dark side of light signalling. *Current biology: CB*, *18*(24), R1144–6. doi:10.1016/j.cub.2008.10.034
- Jung, J.-H., Seo, P. J., Ahn, J. H., & Park, C.-M. (2012). Arabidopsis RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(19), 16007–16016.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., ... Weigel, D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, *286*(5446), 1962–1965.
- Khanna, R., Shen, Y., Marion, C. M., Tsuchisaka, A., Theologis, A., Schäfer, E., & Quail, P. H. (2007). The basic helix-loop-helix transcription factor PIF5 acts on ethylene biosynthesis and phytochrome signaling by distinct mechanisms. *The Plant cell*, *19*(12), 3915–3929.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E. a, Al-Sady, B., Lanzatella, C., & Quail, P. H. (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *The Plant Cell*, *16*(11), 3033–3044.
- 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.
- Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P., & Ahn, J. H. (2012). The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *159*(1), 461–478.
- Kim, W., Park, T. I., Yoo, S. J., Jun, a R., & Ahn, J. H. (2013). Generation and analysis of a complete mutant set for the Arabidopsis FT/TFL1 family shows specific effects on thermo-sensitive flowering regulation. *Journal of Experimental Botany*, *64*(6), 1715–1729.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., & Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, *286*, 1960–1962.
- Koini, M. a, Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. a, Harberd, N. P., Whitlam, G. C., & Franklin, K. a. (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology*, *19*(5), 408–413.
- Kumar, S. V., Lucyshyn, D., Jaeger, K. E., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N. P., & Wigge, P. a. (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, *484*(7393), 242–245.
- Kumar, S. V., & Wigge, P. a. (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. *Cell*, *140*(1), 136–147.
- Lau, O. S., & Deng, X. W. (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in Plant Science*, *17*(10), 584–593.
- Lee, H., Yoo, S. J., Lee, J. H., Kim, W., Yoo, S. K., Fitzgerald, H., ... Ahn, J. H. (2010). Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, *38*(9), 3081–3093.
- 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 Cell Physiology*, *53*(10), 1802–1814.
- 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.
- Lee, J., Oh, M., Park, H., & Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. *The Plant Journal*, *55*(5), 832–843.

- Leivar, P., Tepperman, J. M., Cohn, M. M., Monte, E., Al-Sady, B., Erickson, E., & Quail, P. H. (2012). Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(4), 1398–1419.
- Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, *16*(1), 19–28.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Monte, E., Calderon, R. H., Liu, T., & Quail, P. H. (2009). Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell*, *21*(11), 3535–3553.
- Leivar, Pablo, Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., ... Quail, P. H. (2008). Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Current Biology*, *18*(23), 1815–1823.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., ... Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Developmental Cell*, *15*(1), 110–120.
- Martínez-García, J. F., Huq, E., & Quail, P. H. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science*, *288*(5467), 859–863.
- Mathews, S., & Sharrock, R. a. (1997). Phytochrome gene diversity. *Plant, Cell and Environment*, *20*(6), 666–671.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., & Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *Plos Biology*, *7*(7), 1–15.
- Matsoukas, I. G., Massiah, A. J., & Thomas, B. (2012). Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant & Cell Physiology*, *53*(11), 1827–1842.
- Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (1999). FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *The Plant Cell*, *11*(5), 949–956.
- Mitsuda, N., Hisabori, T., Takeyasu, K., & Sato, M. H. (2004). VOZ; Isolation and Characterization of Novel Vascular Plant Transcription Factors with a One-Zinc Finger from Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology*, *45*(7), 845–854.
- Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y., Dolan, S., & Lin, C. (2003). Regulation of photoperiodic flowering by Arabidopsis photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(4), 2140–2145.
- Monte, E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., ... Quail, P. H. (2003). Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *The Plant Cell*, *15*(9), 1962–1980.
- Nagatani, A. (2004). Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(6), 708–711.
- Nakai, Y., Nakahira, Y., Sumida, H., Takebayashi, K., Nagasawa, Y., Yamasaki, K., ... Sato, M. H. (2013). Vascular plant one-zinc-finger protein 1/2 transcription factors regulate abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *73*(5), 761–775.
- Neff, M. M., Fankhauser, C., & Chory, J. (2000). Light: an indicator of time and place. *Genes & Development*, *14*, 257–271.
- 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*(808), 1–8.
- Oyama, T., Shimura, Y., & Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Development*, *11*(22), 2983–2995.
- Penfield, S. (2008). Temperature perception and signal transduction in plants. *New Phytologist*, *179*, 615–628.
- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S., & Hwang, I. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *The Plant Cell*, *19*(9), 2749–2762.

- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., & Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target Genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science*, *288*, 1613–1616.
- Scortecci, K., Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (2003). Genetic interactions between FLM and other flowering-time genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, *52*, 915–922.
- Seo, H. ., Watanabe, E., Tokutomi, S., Nagatani, A., & Chua, N. . (2004). Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling. *Genes Development*, *18*(6), 617–622.
- Sessa, G., Carabelli, M., Sassi, M., Ciolfi, A., Possenti, M., Mitterpergher, F., ... Ruberti, I. (2005). A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes Development*, *19*(23), 2811–2815.
- Sharrock, R. a, & Quail, P. H. (1989). Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes & Development*, *3*(11), 1745–1757.
- Sharrock, R. A., Clack, T., & Goosey, L. (2003). Differential activities of the Arabidopsis phyB/D/E phytochromes in complementing phyB mutant phenotypes. *Plant Molecular Biology*, *52*, 135–142.
- Shen, H., Moon, J., & Huq, E. (2005). PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *44*(6), 1023–1035.
- Shin, J., Kim, K., Kang, H., Zulfugarov, I. S., Bae, G., Lee, C., ... Choi, G. (2009). Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(18), 7660–7665.
- Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature*, *407*(6804), 585–591.
- Somers, D. E., & Quail, P. H. (1995). Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *7*, 413–427.
- Strasser, B., Alvarez, M. J., Califano, A., & Cerda, P. D. (2009). A complementary role for ELF3 and TFL1 in the regulation of flowering time by ambient temperature. *The Plant Journal*, *58*, 629–640.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, *410*, 1116–1120.
- Swatek, K. ., Graham, K., Agrawal, G. ., & Thelen, J. . (2011). The 14-3-3 isoforms chi and epsilon differentially bind client proteins from developing Arabidopsis seed. *Journal of Proteome Research*, *10*(9), 4076–4087.
- Takada, S., & Goto, K. (2003). TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *The Plant Cell*, *15*, 2856–2865.
- Tao, Z., Shen, L., Liu, C., Liu, L., Yan, Y., & Yu, H. (2012). Genome-wide identification of SOC1 and SVP targets during the floral transition in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *70*, 549–561.
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Kojima, C., & Shimamoto, K. (2013). Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends in Plant Science*, *18*(5), 287–294.
- Tepperman, J. M., Hudson, M. E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S. H., Wang, X., & Quail, P. H. (2004). Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *The Plant Journal*, *38*(5), 725–739.
- Tepperman, J. M., Zhu, T., Chang, H., Wang, X., & Quail, P. H. (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(16), 9437–9442.
- Turck, F., & Coupland, G. (2011). When vernalization makes sense. *Science*, *331*(6013), 36–37.

- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, *303*, 1003–1006.
- Wigge, P. a. (2013). Ambient temperature signalling in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *23*, 1–6.
- Yadav, V., Kundu, S., Chattopadhyay, D., Negi, P., Wei, N., Deng, X.-W., & Chattopadhyay, S. (2002). Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and downstream regulatory components, COP1 and HY5, in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *31*(6), 741–753.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., & Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant & Cell Physiology*, *46*(8), 1175–1189.
- Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature*, *419*(6904), 308–312.
- Yasui, Y., Mukougawa, K., Uemoto, M., Yokofuji, A., Suzuri, R., Nishitani, A., & Kohchi, T. (2012). The phytochrome-interacting VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(8), 3248–3263.
- Yoshida, R. o, Fekih, R., Fujiwara, S., Oda, A., Miyata, K., Tomozoe, Y., ... Mizoguchi, T. (2009). Possible role of early flowering 3 (ELF3) in clock-dependent floral regulation by short vegetative phase (SVP) in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, *182*(4), 838–850.
- Zhang, Y., Mayba, O., Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J. M., Speed, T. P., & Quail, P. H. (2013). A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in Arabidopsis. *Plos Genetics*, *9*(1), e1003244.

## ANEXO

Los siguientes análisis estadístico se han realizado mediante análisis de la varianza (ANOVA de 1-vía) y el test para comparaciones múltiples de Bonferroni, calculado sobre un intervalo de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Los asteriscos indican la significación estadística: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns, No significativo ( $p > 0,05$ ). Se muestra por separado el análisis de las dos réplicas biológicas. NC = no concluyente con los datos obtenidos en las dos réplicas biológicas analizadas

Apartado “I. Efecto de la regulación por la luz”

**Tabla 12. Tiempo de floración de las combinaciones de mutantes *phyB* y *tem1/tem2* en SD**

HOJAS TOTALES	Exp.1			Exp.2			Exp.1 vs 2
	Significación		valor $p$	Significación		valor $p$	Resumen
Col-0 vs. <i>phyB-9</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,3306	Sí	*	0,0119	NO
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	*	0,0245	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	No	ns	>0,9999	No	ns	>0,9999	NO
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	No	ns	>0,9999	Sí	****	<0,0001	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyBtem2</i>	No	ns	>0,9999	No	ns	0,2512	NO
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	No	ns	>0,9999	Sí	****	<0,0001	NC
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	No	ns	>0,9999	NC
<i>phyB-9tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
<b>DÍAS</b>							
Col-0 vs. <i>phyB-9</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,2391	Sí	*	0,0213	NO
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	No	ns	>0,9999	Sí	****	<0,0001	NC
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	*	0,0227	No	ns	>0,9999	NO
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	*	0,0311	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyBtem2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	**	0,0063	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	No	ns	0,6305	Sí	****	<0,0001	NC
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	***	0,0007	SÍ
<i>phyB-9tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	<0,0001	Sí	****	<0,0001	SÍ

**Tabla 13. Tiempo de floración de las combinaciones de mutantes *phyB* y *tem1/tem2* en LD**

HOJAS TOTALES	Exp.1		Exp.2		Exp.1 vs 2 Resumen		
	Significación	valor $p$	Significación	valor $p$			
Col-0 vs. <i>phyB-9</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	**	0,0044	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	****	< 0,0001	NC
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	****	< 0,0001	NC
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	No	ns	0,3442	No	ns	> 0,9999	NO
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	*	0,0203	NO
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyBtem2</i>	Sí	**	0,0039	Sí	***	0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	**	0,0025	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	No	ns	0,1826	NC
<i>phyB-9tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<b>DÍAS</b>							
Col-0 vs. <i>phyB-9</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,1898	NO
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	***	0,0008	SÍ
<i>phyB-9</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	**	0,0021	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyBtem2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,5655	No	ns	> 0,9999	NO
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem2-2</i>	Sí	***	0,0002	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9tem1-1</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>phyB-9tem2-2</i> vs. <i>phyB-9tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ

**Tabla 14. Tiempo de floración de plantas mutantes y sobre-expresantes PIF en SD**

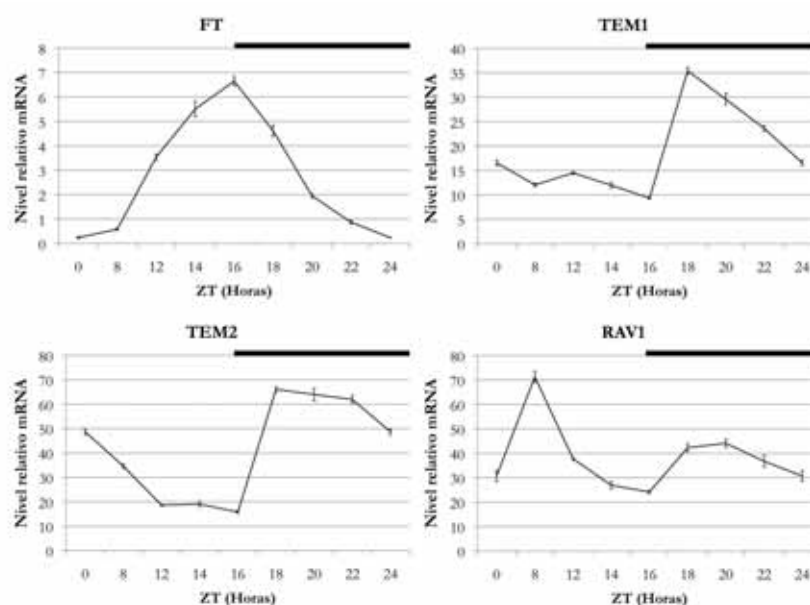
HOJAS TOTALES	Exp.1			Exp.2			Exp.1 vs 2 Resumen
	Significación		valor $p$	Significación		valor $p$	
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>pifQ</i>	No	ns	> 0,9999	-	-	-	-
<i>tem1tem2</i> vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-
<i>PIF5ox</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-
<b>DÍAS</b>							
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>PIF5ox</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	****	< 0,0001	NC
<i>tem1tem2</i> vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí

**Tabla 15. Tiempo de floración de plantas mutantes y sobre-expresantes PIF en LD**

HOJAS DE ROSETA	Exp.1			Exp.2			Exp.1 vs 2 Resumen
	Significación		valor $p$	Significación		valor $p$	
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>pifQ</i>	No	ns	> 0,9999	-	-	-	-
<i>tem1tem2</i> vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	**	0,0024	No	ns	0,3017	NC
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-
<i>PIF5ox</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-
<b>HOJAS TOTALES</b>							
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>pifQ</i>	No	ns	> 0,9999	-	-	-	-
<i>tem1tem2</i> vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	***	0,0005	Sí	*	0,0165	Sí
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-
<i>PIF5ox</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-
<b>DÍAS</b>							
Col-0 vs. <i>tem1tem2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>pifQ</i>	No	ns	0,6139	-	-	-	-
<i>tem1tem2</i> vs. <i>PIF5ox</i>	Sí	****	< 0,0001	No	ns	0,9215	NC
<i>tem1tem2</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-
<i>PIF5ox</i> vs. <i>pifQ</i>	Sí	****	< 0,0001	-	-	-	-



Apartado “II. Efecto de la regulación por la temperatura”



**Figura Suplementaria (S-1). Expresión de los genes *FT*, *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en condiciones de LD a 22°C.** Análisis de los niveles de mRNA a lo largo de 24 h, en plantas silvestres Col-0 de 9 días cultivadas en LD a 22°C en placas de MS1. Las muestras se recogieron cada 2 horas durante el periodo nocturno para confirmar el pico de los genes *TEM1* y *TEM2*. La cuantificación se ha realizado mediante RT-qPCR. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 réplicas técnicas. La barra negra superior indica el periodo nocturno.

**Tabla 22. Tiempo de floración de los mutantes *tem1*, *tem2*, *rav1* cultivados a 22°C o 16°C en LD**

HOJAS DE ROSETA	LD22			LD16		
	Significación	valor <i>p</i>		Significación	valor <i>p</i>	
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí ***	< 0,0001	No ns	0,9119		
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí ***	0,0007		
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí ***	< 0,0001		
Col-0 vs. <i>rav1-1</i>	No ns	> 0,9999	No ns	> 0,9999		
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	No ns	0,1039		
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí *	0,0169		
<i>tem1-1</i> vs. <i>rav1-1</i>	Sí ***	< 0,0001	No ns	0,6512		
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	No ns	> 0,9999		
<i>tem2-2</i> vs. <i>rav1-1</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí **	0,0010		
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>rav1-1</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí ***	0,0001		
<b>HOJAS TOTALES</b>						
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí ***	< 0,0001	No ns	0,7550		
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí ***	0,0008		
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí ***	< 0,0001		
Col-0 vs. <i>rav1-1</i>	No ns	> 0,9999	No ns	> 0,9999		
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	No ns	0,1409		
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí *	0,0227		
<i>tem1-1</i> vs. <i>rav1-1</i>	Sí ***	0,0002	No ns	0,4471		
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí ***	0,0004	No ns	> 0,9999		
<i>tem2-2</i> vs. <i>rav1-1</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí ***	0,0009		
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>rav1-1</i>	Sí ***	< 0,0001	Sí ***	< 0,0001		

**Tabla 23. Tiempo de floración de mutantes *tem1 tem2* y *svp-41* cultivados a 22°C o 16°C en LD**

LD22	Exp.1			Exp.2			Exp.1 vs 2
	Significación	valor <i>p</i>	Significación	valor <i>p</i>	Resumen		
<b>HOJAS TOTALES</b>							
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,2301	NO
<b>DÍAS</b>							
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,5356	NC
<b>LD16</b>							
<b>HOJAS TOTALES</b>							
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<b>DÍAS</b>							
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	**	0,0049	Sí	***	< 0,0001	SÍ

**Tabla 24. Tiempo de floración de las combinaciones de *svp-41* con mutantes *tem*, en LD 22°C**

HOJAS DE ROSETA - LD22	Exp.1			Exp.2			Exp. 1+2
	Significación	valor <i>p</i>	Significación	valor <i>p</i>	Resumen		
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	0,0005	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí	**	0,0061	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0020	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,6912	NC
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	**	0,0019	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	*	0,0439	No	ns	0,0864	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,9125	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	*	0,0138	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	**	0,0056	NC
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	0,0006	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,2241	Sí	***	< 0,0001	NC
<i>svp-41tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO

**Continuación Tabla 24.**

HOJAS TOTALES - LD22	Exp.1			Exp.2			Exp. 1+2
	Significación	valor $p$		Significación	valor $p$		Resumen
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	***	0,0001	No	ns	0,1836	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	No	ns	0,5490	Sí	***	< 0,0001	NC
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	0,0002	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	0,0002	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,0567	NO
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	***	< 0,0001	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	No	ns	0,6202	No	ns	> 0,9999	NO
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,3256	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	**	0,0021	Sí	**	0,0011	SÍ
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,0720	No	ns	0,1285	NO
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	**	0,0083	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,2578	Sí	***	< 0,0001	NC
<i>svp-41tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO

**Continuación Tabla 24.**

<b>DÍAS – LD22</b>	<b>Exp.1</b>			<b>Exp.2</b>			<b>Exp. 1+2</b>
	<b>Significación</b>	<b>valor <math>p</math></b>		<b>Significación</b>	<b>valor <math>p</math></b>		<b>Resumen</b>
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	**	0,0030	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,0660	Sí	*	0,0108	NO
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	0,2834	NO
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	**	0,0073	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	***	0,0003	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	No	ns	0,7003	No	ns	> 0,9999	NO
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	0,0004	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	*	0,0257	No	ns	0,3944	NO
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	**	0,0099	No	ns	0,9978	NC
<i>svp-41tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	> 0,9999	NC

**Tabla 25. Tiempo de floración de las combinaciones de *svp-41* con mutantes *tem*, en LD 16°C**

HOJAS DE ROSETA - LD16	Exp.1			Exp.2			Exp. 1+2 Resumen
	Signific.	valor $p$		Signific.	valor $p$		
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	No	ns	0,4703	NC
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	*	0,0163	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	*	0,0239	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,6588	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	**	0,0034	No	ns	0,3054	NC
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,1652	No	ns	0,1946	NO
<i>svp-41tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO

**Continuación Tabla 25.**

HOJAS TOTALES - LD16	Exp.1			Exp.2			Exp. 1+2
	Signific.	valor $\rho$		Signific.	valor $\rho$		Resumen
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí	**	0,0026	No	ns	> 0,9999	NC
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	0,0008	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	0,0003	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	SÍ
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	*	0,0427	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	**	0,0017	No	ns	0,4371	NC
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	0,1440	No	ns	0,4371	NO
<i>svp-41tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO

Continuación Tabla 25.

DÍAS - LD16	Exp.1			Exp.2		Exp. 1+2	
	Signific.	valor $\rho$		Signific.	valor $\rho$	Resumen	
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
Col-0 vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	No	ns	0,4200	NC
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	****	< 0,0001	Sí	****	< 0,0001	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41</i>	Sí	***	0,0007	Sí	**	0,0010	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	0,4977	Sí	**	0,0013	NC
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	Sí	**	0,0015	Sí	**	0,0013	SÍ
<i>tem1-1tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	Sí	**	0,0015	Sí	***	0,0004	SÍ
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41tem1-1</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO
<i>svp-41tem2-2</i> vs. <i>svp-41tem1-1tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	No	ns	> 0,9999	NO

**Tabla 26. Tiempo de floración de los mutantes *tem*, en SD 27°C**

HOJAS DE ROSETA	Exp. 1			Exp. 2			Exp. 3		
	Significación		valor $p$	Significación		valor $p$	Significación		valor $p$
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	*	0,0123	No	ns	> 0,9999
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	**	0,0090	Sí	**	0,0014	Sí	***	< 0,0001
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	**	0,0090	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
<b>HOJAS TOTALES</b>									
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	No	ns	> 0,9999	Sí	**	0,0048	No	ns	0,0826
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	*	0,0387	Sí	*	0,0122	Sí	***	0,0003
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	**	0,0024	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
<b>DÍAS</b>									
Col-0 vs. <i>tem1-1</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
Col-0 vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
Col-0 vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	*	0,0367	Sí	***	< 0,0001
<i>tem1-1</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001
<i>tem2-2</i> vs. <i>tem1-1tem2-2</i>	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001	Sí	***	< 0,0001



**CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES TEM/RAV EN LA  
ESPECIE MODELO *Populus sp***

---

## INTRODUCCIÓN

### 1. Ciclo vital de árboles del género *Populus*

Gracias a la implementación de herramientas bioquímicas, genéticas y genómicas, como la secuenciación de *Populus trichocarpa* en el año 2006 (Tuskan et al, 2006), se ha avanzado rápidamente en el conocimiento de procesos propios de especies perennes arbóreas, como son la formación de madera o la parada estacional del crecimiento y la dormancia, además de enriquecer el conocimiento en otras áreas como el control estacional de la floración. Por todo ello, el género *Populus* se ha convertido en el modelo para este tipo de plantas (revisado en (Jansson & Douglas, 2007).

Las especies del género *Populus*, leñosas perennes, tienen un periodo juvenil que puede durar años o décadas. Durante este periodo los árboles no son capaces de responder a los estímulos ambientales que inducen la floración, pero sí responden a las condiciones ambientales que promueven la parada estacional del crecimiento y la entrada en la dormancia. Estas adaptaciones les permiten iniciar la respuesta reproductora en las condiciones óptimas de crecimiento (cuando ya han alcanzado la madurez y son competentes para formar las estructuras reproductoras), evitando las estaciones del año más desfavorables, y sobreviviendo a ellas mediante la protección de las yemas que darán brotes nuevos la siguiente temporada favorable. En climas templados, el ciclo anual de estas especies se puede dividir en una fase de crecimiento activo y una fase de parada del crecimiento acorde con las transiciones estacionales que presentan estos climas. La fase de crecimiento activo está delimitada por condiciones ambientales favorables de luz y temperatura, mientras que la parada estacional del crecimiento se produce con el acortamiento de los días y la bajada progresiva de las temperaturas. Con la parada estacional, se forman las yemas que protegerán a los brotes jóvenes del frío del invierno; y seguidamente, se inicia la dormancia, cuando la bajada de la temperatura es más pronunciada. Este estado favorece la adaptación y es crucial para la supervivencia en climas con inviernos muy fríos (revisado en Rohde & Bhalerao, 2007).

#### 1.1 Control de la fase juvenil

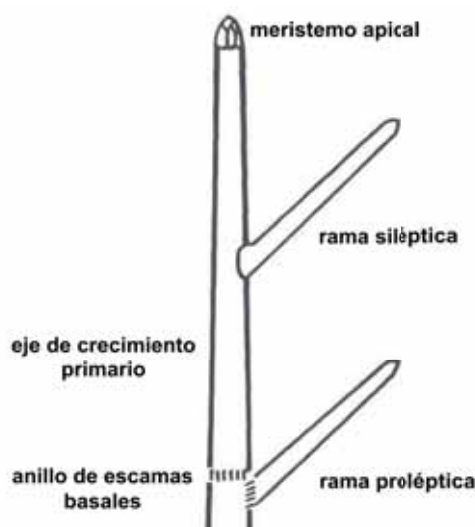
Como se ha comentado en el capítulo 1, en especies anuales como *Arabidopsis thaliana* la fase juvenil muestra un fenotipo característico de morfología foliar, fundamentalmente hojas redondeadas con tricomas sólo en la cara adaxial (superior). Con el paso a la fase adulta, las hojas presentan rasgos adultos, forma alargada, márgenes serrados y tricomas también en la cara abaxial (inferior) del limbo. En esta fase, cuando llega el momento de la iniciar la reproducción, se alarga el tallo y se forman los órganos florales. En especies leñosas coexisten hojas jóvenes y adultas, ya que diferentes partes de la planta se encuentran en diferentes fases de desarrollo (Huijser & Schmid, 2011). Por ejemplo, en árboles ya adultos es fácil observar que los tallos más próximos a la base se comportan como tallos juveniles y forman hojas con

rasgos juveniles y nunca flores; los tallos situados en la parte más alta, formados con anterioridad, se comportan como tallos adultos, forman hojas con rasgos adultos y tienen la capacidad de desarrollar órganos florales (Poethig, 2010). En cuanto a las hojas, las jóvenes se distinguen de las adultas en la longitud del peciolo, el tamaño del limbo, los márgenes y, al contrario de lo que sucede en *Arabidopsis*, la presencia de tricomas abaxiales (Critchfield, 1960).

Al igual que se ha descrito para *Arabidopsis*, el módulo miR156/miR172 y sus respectivos genes diana, *SPL* y *AP2*, parecen controlar los cambios de fase (juvenil-a-adulta y transición floral) en el género *Populus*; también se han observado patrones de expresión temporal similares en otras especies de leñosas, en los géneros *Acacia*, *Eucalyptus*, *Hedera* y *Quercus*; además de estar conservados en *Oryza sativa* y *Zea mays* (Wang et al., 2011). En *Populus x canadensis* se ha observado que la sobre-expresión de miR156 provoca una reducción en los niveles de los genes *SPL* y del miRNA miR172, lo que provoca una prolongada fase juvenil, retrasando el cambio de fase (Wang et al, 2011).

## 1.2 Crecimiento y floración

Durante el crecimiento activo, las ramas nuevas surgen de yemas axilares o laterales. Existen dos tipos de ramas: las prolépticas y las silépticas. Las ramas prolépticas provienen de yemas que han pasado por un periodo de frío, típicamente asociado con la dormancia invernal. Por su parte, las silépticas surgen de yemas que no han pasado por un periodo de frío y aparecen durante la etapa juvenil (Fig. 1).



### Figura 89. Esquema de la formación de ramas silépticas y prolépticas

Las yemas prolépticas, formadas después de un periodo de frío, presentan cicatrices (anillo de escamas basales) en la base de la rama nueva. Cuando las yemas se desarrollan y elongan al mismo tiempo que la rama de la que nacen (y no muestran escamas de crecimiento), se denominan ramas silépticas.

Las ramas silépticas pueden jugar un papel importante en el crecimiento del árbol, su arquitectura y adaptación, sobretodo en árboles que crecen en regiones templadas. Además, la

ramificación siléptica incrementa significativamente el crecimiento general del árbol, sobretodo durante los primeros años. Parece existir plasticidad fenotípica en la formación de las ramas silépticas, las cuales están sometidas al control genético y ambiental (Wu & Hinckley, 2001).

Por otra parte, las especies de *Populus* producen dos tipos de tallos. Los tallos cortos presentan un crecimiento predeterminado e independiente del fotoperiodo, y los tallos largos que crecen hasta que las condiciones ambientales son desfavorables (condiciones de SD) cuando se inicia la parada estacional del crecimiento y la formación de las yemas (revisado en Pin & Nilsson, 2012).

En cuanto a la floración, existen dos importantes diferencias entre la de especies leñosas perennes y la de plantas anuales. La característica principal de las especies perennes es que florecen tras una larga fase juvenil. La segunda diferencia tiene que ver con la identidad de los meristemas. En *Arabidopsis*, la floración provoca un cambio irreversible en el meristemo apical del tallo, que se convierte en inflorescente. En la mayoría de las especies perennes sólo algunos meristemas son reproductivos y forman las flores, mientras otros mantienen su crecimiento vegetativo durante y después de la floración. De esta manera, los árboles pueden florecer y formar las semillas repetidamente durante su ciclo vital, mientras que las plantas anuales sólo lo hacen una vez (revisado en Bergonzi & Albani, 2011).

Las especies de *Populus spp.* son dioicas, lo que quiere decir que presentan estructuras reproductivas masculinas y femeninas en individuos distintos, hecho que les obliga a coordinar el momento en que inician la reproducción. La floración en *Populus spp* se produce al inicio de la primavera con el incremento de horas de luz y el ascenso de la temperatura. Las yemas florales se desarrollan durante la primavera, crecen durante el verano y entran en dormancia durante los meses desfavorables, abriéndose al inicio de la siguiente estación favorable (Boes & Strauss, 1994). La eclosión de las yemas florales se produce antes de que se abran las primeras yemas vegetativas que han resistido al invierno, lo que favorece la diseminación del polen y las semillas (revisado en Jansson & Douglas, 2007).

### **Conservación del módulo CO/FT**

En *Arabidopsis*, la inducción fotoperiódica de *FT* que dispara la floración está mediada por la acción de *CO* (Suárez-López et al., 2001; Wigge et al., 2005). En arroz (*Oryza sativa*), planta modelo para especies monocotiledóneas, los genes *Hd3a* y *Hd1* se han descrito como ortólogos de *FT* y *CO* respectivamente y, al igual que ellos, actúan induciendo la floración (en el caso del arroz, induciéndola en condiciones de SD y reprimiéndola en LD) (Kojima et al., 2002; Yano et al., 2000). Parece que el módulo regulador CO/FT está muy conservado evolutivamente y es funcional en otras dicotiledóneas; entre ellas *Solanum tuberosum* (patata), donde controla la tuberización (González-Schain et al., 2012), y *Populus sp.* (chopo) (Böhlenius et al., 2006). La regulación del módulo CO/FT en *Populus sp.*, parece ser similar a la descrita en *Arabidopsis*, donde la coincidencia de *CO* con el período de luz determina la activación de *FT*. Pero a

diferencia de lo que ocurre en la planta anual, las respuestas que se originan en la perenne parecen tener dos funciones: (1) iniciar el desarrollo floral en primavera cuando los días son más largos, y (2) controlar la parada de crecimiento en otoño cuando los días se acortan (Böhlenius et al., 2006).

En *Populus spp.* existen dos genes homólogos<sup>2</sup> muy próximos al gen *CONSTANS* de *Arabidopsis*, *CO1* (*PtCO1*) y *CO2* (*PtCO2*), los cuales se agrupan en el mismo árbol filogenético. A diferencia de lo anteriormente publicado, un artículo reciente describe que la sobre-expresión de *PdCO1* y de *PdCO2* de *Populus deltoides* en *P. alba* x *P. tremula*, individualmente o de forma conjunta, no altera el inicio normal de la reproducción, la apertura de las yemas o la entrada en la dormancia, aunque sí se observa un cambio fenotípico relacionado con el crecimiento (los árboles son más pequeños) (Hsu et al., 2012). Según estos autores ni *CO1* ni *CO2* estarían implicados en la apertura de yemas en primavera o la formación de las mismas en otoño. En cambio, Böhlenius y colaboradores observaron que la construcción de silenciamiento RNAi *CO2* provoca un adelanto en la parada estacional y la formación de las yemas cuando esas plantas se transfieren de LD a SD. Aunque ambos grupos coinciden en que la expresión de *CO2* en plantas silvestres muestra un pico de expresión que coincide con el final del día y que es más abundante en la estación de crecimiento, no han observado cambios en la expresión de *PdCO1* ni de *PdCO2* en diferentes condiciones ambientales de fotoperiodo o temperatura, por lo que creen que no están regulados por factores ambientales.

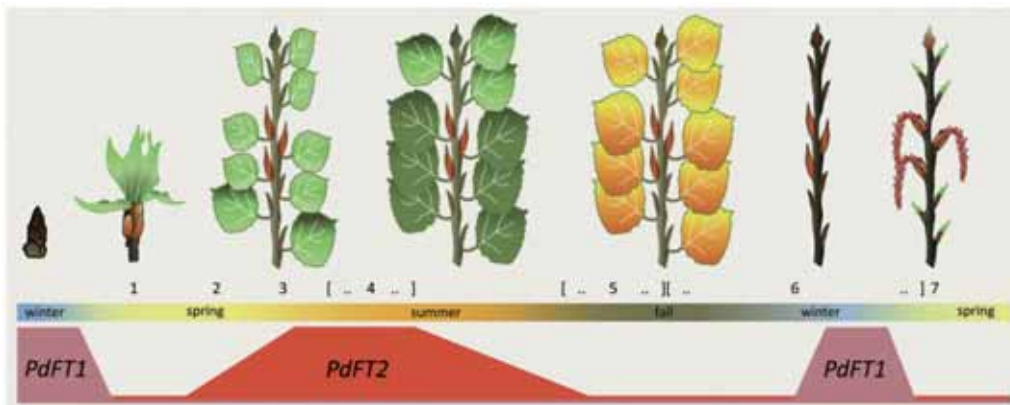
En el caso de *FT*, existen también dos genes homólogos *PtFT1* y *PtFT2*. Se ha observado que las plantas que sobre-expresan *PtFT1* son capaces de producir flores después de tan sólo unos meses en el invernadero, lo que sugiere que *PtFT1* podría ser un potente inductor de la floración (Böhlenius et al., 2006; Hsu et al., 2011). Además, esas plantas son insensibles a los cambios de fotoperiodo, lo que induce la formación de flores y la ausencia de formación de yemas en condiciones de SD debido a que no hay parada estacional del crecimiento. De manera complementaria, las plantas que silencian *FT1* (RNAi *FT1*) son más sensibles al acortamiento del fotoperiodo y forman yemas vegetativas más pronto que las plantas silvestres (Böhlenius et al., 2006). El análisis de expresión de *PtFT1* en árboles de diferentes edades muestra que incrementa gradualmente con la edad, y cuando alcanza un determinado umbral se inicia la inducción floral; el mismo estudio muestra un pico de expresión máximo anual durante la estación de crecimiento (Bohlenius et al., 2006). Otros estudios han aportado información adicional sobre la expresión de *FT1*, que también parece estar inducido por las bajas temperaturas (4°C). Estos resultados sugieren que *PdFT1* podría inducir la formación de las flores en respuesta al invierno, en yemas axilares durmientes, al detectarse una expresión basal durante el crecimiento vegetativo y una expresión más acusada durante el invierno en hojas pre-formadas en el interior de las yemas, tallos, ápices, yemas vegetativas y yemas reproductivas

---

<sup>2</sup> Dos genes son homólogos cuando comparten una secuencia de DNA ancestral común. El término homología se puede aplicar a la relación entre genes separados por un proceso de especiación (entonces son denominados ortólogos) o por un evento de duplicación génica (denominados parálogos).

(Hsu et al., 2011). Durante el invierno, el reloj circadiano no es funcional, y ciertos árboles, como *Populus*, pierden las hojas, por lo que la inducción de *PtFT1* podría no estar regulada de la misma manera que en *Arabidopsis*. Acorde con la expresión que muestra *PdFT1* en varios tejidos durante el invierno, éste podría enviar una señal desde las hojas pre-formadas que se encuentran en las yemas durmientes, un año antes de que la flor sea visible. Por su parte, *PdFT2* también muestra un incremento de expresión con la edad de la planta. Sin embargo, éste se expresa predominantemente durante el periodo de crecimiento, únicamente en hojas y yemas reproductivas (Hsu et al., 2011).

Inicialmente se consideró que la sobre-expresión de FT1 y de FT2 produce una aceleración de la floración (Böhlenius et al., 2006; Hsu et al., 2006). Sin embargo estudios posteriores han matizado el papel de FT2, cuya sobre-expresión sólo acelera la floración ligeramente y su silenciamiento indica que no es necesario para inducirla (Hsu et al., 2011), por lo que se considera que no tiene una función clara en la floración. Sin embargo, ambos incrementan su expresión a lo largo del desarrollo; por ello, al menos en el caso de FT1, se ha propuesto la hipótesis de que estos árboles han de alcanzar un cierto umbral de expresión de FT para inducir la floración, de la misma manera que ocurre en *Arabidopsis* (Bohlenius et al., 2006; Hsu et al., 2006). Parece que *PtFT1* y *PtFT2* podrían no ser redundantes en la inducción floral, y se ha sugerido que *PtFT2* podría estar implicado en el crecimiento activo, mientras que *PtFT1* podría ser responsable de la inducción de la floración (Fig. 2) (Hsu et al., 2011).



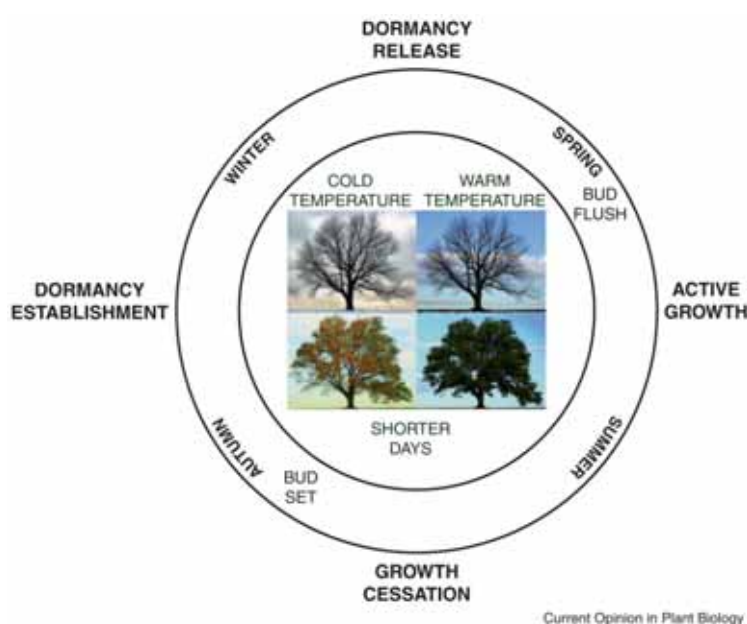
**Figura 90. Esquema de la función de los genes parálogos PdFT1 y PdFT2 en *Populus deltoides*** *PdFT1* (rosa) y *PdFT2* (rojo) actúan en distintos momentos a lo largo del año para controlar el inicio de la floración y la parada del crecimiento estacional durante una temporada de crecimiento. Los números indican las distintas fases de desarrollo estacional. 1, eclosión de las yemas (mediados de marzo); 2/7, inicio de la floración y expansión floral (principios de marzo/abril); 3, completa extensión de los tallos (mediados de mayo); 4, alargamiento y desarrollo de los órganos florales; 5, parada estacional del crecimiento y formación de yemas; 6, dormancia; 7, floración. Figura extraída de (Pin & Nilsson, 2012).

### 1.3 Parada estacional del crecimiento

Para sobrevivir en el amplio rango de condiciones climáticas, más o menos severas, de los climas templados, los árboles han desarrollado adaptaciones locales, iniciando antes o después

su parada estacional del crecimiento, según la latitud en la que crecen.

Hay dos señales ambientales que determinan la parada estacional del crecimiento: el fotoperiodo y la temperatura. La parada estacional del crecimiento se induce al final del verano, cuando los días se acortan y el fotoperiodo cae por debajo de un cierto umbral dependiente de la latitud (fotoperiodo crítico) (Fig. 3). Este fenómeno está precedido por una ralentización del crecimiento, visible en la longitud de los internodos (más cortos), seguida por la formación de yemas terminales protectoras. La función principal de las yemas es la de evitar el daño por congelación durante el periodo invernal. Es esencial para los meristemas de las especies leñosas que viven en regiones templadas cesar el crecimiento y adquirir resistencia al frío, con la formación de escamas en las yemas, deshidratación y acumulación de proteínas que otorgan resistencia al frío y azúcares, antes de que empiece el frío (revisado (Eriksson & Webb, 2011).



**Figura 91. Esquema de las distintas transiciones estacionales en el desarrollo de *Populus***

La transición desde la fase de crecimiento activo a la dormancia se produce en respuesta a las señales ambientales determinadas por el acortamiento de los días y la baja de la temperatura. Cuando el fotoperiodo se acorta y alcanza un nivel crítico durante el otoño, se inician las respuestas de parada del crecimiento y la formación de las yemas (bud set), inmediatamente después se inicia la dormancia en invierno. Después de una prolongada exposición al frío se reinicia el crecimiento activo (iniciado por la eclosión de las yemas – bud flush), por exposición a la creciente duración de los días y la subida de la temperatura en primavera. Figura extraída de (Petterle et al., 2013).

Böhlenius y colaboradores (2006) han descrito que en las latitudes más altas el umbral de fotoperiodo en que los árboles inician su parada estacional es de 21 horas (cuando los días son aún bastante largos), mientras que más al sur es menor, de alrededor de 15 horas (cuando los días son considerablemente más cortos). Esta diferencia es un rasgo adaptativo local, y parece estar regulado mediante un estricto control genético. Según estos autores, el módulo regulador PtCO/PtFT tiene un importante papel al medir el fotoperiodo y asegurar que la parada del crecimiento y la formación de las yemas se inicia antes del invierno (Böhlenius et al., 2006). Un

reciente estudio cuestiona la implicación de CO en este proceso (Hsu et al., 2012).

Sin embargo, parece que la temperatura también podría jugar un papel en la formación y apertura de las yemas en *Populus* (revisado en (Jansson & Douglas, 2007; Rohde et al., 2011)). La apertura de las yemas se produce aún en condiciones de día corto si se compensa por condiciones adecuadas de temperatura; pero si con el paso de los días la subida de las temperaturas no va acompañada de un incremento del fotoperiodo, las yemas pararán su crecimiento y entrarán de nuevo en fase de dormancia (revisado Jansson & Douglas, 2007).

#### **1.4 Dormancia**

La exposición continuada a bajas temperaturas da lugar a la dormancia (revisado en Rohde & Bhalerao, 2007). Los árboles pasan por una fase de dormancia entre la parada estacional de crecimiento (en otoño) y la fase de crecimiento activo (en primavera-verano). En general este término se usa para describir la suspensión temporal del crecimiento general de la planta; sin embargo, únicamente el tejido meristemático será durmiente. La acumulación de frío es necesaria para la reactivación del crecimiento activo, y la dormancia es crucial para asegurar la supervivencia y protección de los tejidos meristemáticos durante los inviernos fríos.

En *Populus sp.*, tanto la entrada en la dormancia como la apertura de las yemas durmientes en la siguiente estación favorable no depende de la duración del día sino de la temperatura (Heide & Prestrud, 2005). Además, estos procesos podrían ser también independientes del reloj circadiano, ya que se ha demostrado que éste no es funcional en *Populus* a bajas temperaturas (Ibáñez et al., 2010).

## **2. Genes de la familia RAV en especies leñosas**

El genoma de *Populus trichocarpa* contiene la anotación de cinco genes con la misma estructura de los genes *RAV* de *Arabidopsis thaliana*. Las proteínas RAV son factores de transcripción con capacidad de unión a DNA a través de dos dominios: un dominio AP2 y un dominio B3 (Kagaya et al., 1999). Al comparar las proteínas RAV de *A. thaliana* (AtRAV) con las de *P. trichocarpa* (PtRAV) existe una alta homología entre AtRAV1, AtTEM1 y AtTEM2 con PtRAV1 y PtRAV2 (Moreno-Cortés et al., 2012).

Durante el desarrollo de nuestro trabajo de caracterización de los genes *RAV* de *Populus spp.* (del cual se presenta a continuación un manuscrito no publicado), apareció el trabajo de Moreno-Cortés y colaboradores (2012), anteriormente mencionado, que relaciona el gen *RAV1* de *Castanea sativa* (*CsRAV1*) con la formación temprana de ramas silépticas. Los autores de dicho estudio han observado que al expresar la región codificante del gen *CsRAV1* bajo el control de un promotor constitutivo en el híbrido *P. tremula x P. alba*, los árboles desarrollan ramas silépticas después de un breve periodo de tiempo, a partir de yemas laterales. Este resultado indica que la sobre-expresión de *RAV1* de *C. sativa* en *P. tremula x P. alba* induce la formación temprana de ramas silépticas, lo que conlleva un incremento en la producción de biomasa, con el consiguiente interés agronómico y comercial.



## MANUSCRITO

The *Populus* homologs of the *Arabidopsis* *TEMPRANILLO* genes are regulators of bud set and early bud dormancy

Esther Marín-González<sup>1</sup>, Maria Klintonäs<sup>2</sup>, Ove Nilsson<sup>2</sup>, Soraya Pelaz<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), Parc de Recerca UAB. Bellaterra (Cerdanyola del Vallés). 08193 Barcelona, Spain., <sup>2</sup>Umeå Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Sciences, 901-83 Umeå, Sweden; <sup>3</sup>ICREA (Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats), 08010 Barcelona, Spain

*Manuscript (November 2012)*

### Author for correspondence

Soraya Pelaz

Tel: + 34 93 563 6600

Fax: + 34 93 563 6601

Email: [soraya.pelaz@cragenomica.es](mailto:soraya.pelaz@cragenomica.es)

### Abstract

Trees exhibit a prolonged period of vegetative growth known as the juvenile period, in which they are unable to induce flowering in response to inductive environmental cues. *Arabidopsis* research has recently provided some new insights into this field, suggesting that the *TEMPRANILLO* (*TEM*) genes, members of the *RAV*-gene family, are important in controlling the length of the juvenile phase.

In the present study, we characterized the *Populus* *TEM* homologs by *in silico* and functional analyses in wild type and transgenic trees under various environmental conditions.

We found that there is no clear *TEM* orthologs in *Populus* but instead two paralogous *RAV* genes, which share sequence and functional characteristics with both the *Arabidopsis* *TEM1/TEM2* and the *RAV1/RAV1like* genes.

Contrary to previous reports, our results show that the *Populus* *TEM* homologs function as inhibitors of sylleptic branching and also play a role in the control of bud set, as well as prevent early bud outgrowth.

**Keywords:** TEMPRANILLO (*TEM*), *RAV*, PtRAV1, PtRAV2, sylleptic branching, bud set, bud dormancy

### Introduction

Trees are known to have a very long juvenile phase when they are incompetent at reacting to flower stimuli in the environment. A considerable amount of time and effort has been spent on trying to find the regulators behind this prolonged juvenility, but it is

still not known what causes this phase to be so extended in trees compared to other plants.

Although the juvenile phase in *Arabidopsis* is of short duration, the plant is not receptive to flowering stimuli under inductive long day (LD) conditions during this period (Bergonzi & Albani, 2011). *TEMPRANILLO* (*TEM*) genes have been found to play an important role in regulating this juvenile phase in *Arabidopsis* by preventing it from inducing flowering at too early an age (Castillejo & Pelaz, 2008).

The *TEM* genes belong to the *RAV* (related to *ABI3* and *VP1*) (Kagaya *et al.*, 1999) family, which in *Arabidopsis* consists of six small (one exon) nuclear proteins that function as monomeric sequence-specific DNA binding transcription factors (Yamasaki *et al.*, 2004) with two conserved DNA-binding domains: one N-terminal AP2/ERF DNA-binding domain (found in other transcription factors like *Arabidopsis* *APETALA2* and tobacco ethylene responsive element binding proteins) and one C-terminal B3 domain (Kagaya *et al.*, 1999). *AtTEM1* is synonymous with *AtRAV2like*, and *AtTEM2* with *AtRAV2*.

Loss of function of *AtTEM1* or *AtTEM2* results in early flowering under both LD and short day (SD) conditions (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008). RNA interference (RNAi) plants reduced in both *AtTEM1* and *AtTEM2* expression (*AtTEM1/2* RNAi) as well as the double *tem1tem2* mutant exhibit earlier flowering than the single *tem1* or *tem2* loss of function mutants (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008), suggesting that they have a redundant function with respect to flowering time. Over-expression of either *AtTEM1* or *AtTEM2* causes extremely late flowering under LD conditions, both with respect to bolting time and number of leaves produced prior to bolting (Castillejo & Pelaz, 2008). *AtTEM1* over-expressors are also late flowering under SDs (Osnato *et al.*, 2012). In agreement with this, soybean *RAV* (*Glycine max* *RAV*) is reported to delay flowering if over-expressed in tobacco (Zhao *et al.*, 2008).

The well-known floral integrator *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) controls flowering in both *Populus* (Bohlenius *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2006) and *Arabidopsis thaliana* (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). *FT* has been found to be a direct target of the *AtTEM1* repressor (Castillejo & Pelaz, 2008). *FT* levels decreased in *35S::AtTEM1* plants but increased in *tem1* and *tem2* loss of function mutants as well as in *TEM1/2* double RNAi and double *tem1tem2* mutant plants (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008). Castillejo and Pelaz (2008) have suggested that the balance between *CONSTANS* (*CO*) and *AtTEMs* could determine *FT* levels. In addition, developmental down-regulation of *AtTEM1* and *AtTEM2* coincided with increasing *FT* levels and subsequent flowering, whereas developmental up-regulation of *FT* was

absent in 35S::*AtTEM1* plants and occurred earlier in *tem1* knockout plants (Castillejo & Pelaz, 2008).

Tree breeders have long desired the ability to shorten the juvenile phase, especially in gymnosperms (which often have a juvenile phase of  $\geq 10$  years), in order to speed up breeding. A faster breeding program would, in the end, result in greater economic profits for the forest industry. The possibility that the *TEM* genes regulate the length of the juvenile phase in *Arabidopsis* and could be conserved in trees is of considerable interest.

Unlike in *Arabidopsis*, where *FT* regulates flowering, poplar *FT* has also been found to regulate growth cessation and bud set (Hsu *et al.*, 2011; Bohlenius *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2006). Moreno-Cortes *et al.* (2012) have argued that the connection between *TEM*, *FT* and *CO* in *Arabidopsis* suggests that the *TEM* orthologs in poplar could be involved in growth cessation and bud set since the *CO/FT* regulatory module has been implicated in those processes in *Populus* (Hsu *et al.*, 2011; Bohlenius *et al.*, 2006). Over-expression of *Castanea sativa RAV1* (*CsRAV1*) has in fact been found to cause extensive sylleptic branching in *Populus tremula x alba* (Moreno-Cortes *et al.*, 2012), indicating that *RAV1* could have a role in regulating bud outgrowth in trees.

In addition to its function in flowering and maturation and its possible role in the regulation of bud set, *TEM* homologs in different species have been shown to affect growth when over-expressed. *Arabidopsis* over-expressing *AtTEM1* or *AtTEM2* and tobacco heterologously over-expressing *GmRAV* under the constitutive CaMV 35S promoter both exhibit dwarf phenotypes (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Moreover, *Populus tremula x alba* over-expressing *CsRAV1* are significantly shorter than non-transgenic plants (Moreno-Cortes *et al.*, 2012).

In this study, we identify the *Populus AtTEM* homologs using *in silico* methods. Further, we characterize their function through phenotypic and expression analysis of wild type (WT) as well as transgenic (*PttRAV1&2 RNAi*) *Populus* under different environmental conditions. The results show that *PttRAV1* and *PttRAV2* function as inhibitors of sylleptic branching and are involved in the control of growth cessation and bud set, as well as in preventing early bud outgrowth.

## Materials and methods

### Phylogenetic Studies

BLAST (tblastn and the “find conserved domain” algorithms on <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Marchler-Bauer *et al.*, 2011; Marchler-Bauer *et al.*, 2009;

Marchler-Bauer & Bryant, 2004) was used to identify RAV homologs in *Populus trichocarpa* and conserved protein domains in the poplar and *Arabidopsis* RAV proteins. The nucleotide sequences were aligned with CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) was used to select the best analysis model. We performed a maximum likelihood phylogeny reconstruction using the recommended settings (Tamura Nei model with invariant sites (Nei & Kumar, 2000)) and complete deletion. The nodal support was estimated by bootstrap based on 1,000 re-samplings. The protein and nucleotide identity table was constructed using AlignX and Vector NTI (Li & Moriyama, 2004).

### **Plant material and growth conditions**

Tissue culture amplified hybrid aspen *Populus tremula x tremuloides*, clone T89 (Nilsson *et al.*, 1992) was used for most experiments. We also used genetically modified T89 plants expressing a *PttRAV1&2* RNAi construct, targeting both *PttRAV1* and *PttRAV2*. Trees were planted on soil and in most cases grown in a greenhouse with natural light supplemented to ensure the day length was not less than 18 h, a temperature ranging from 18-25°C and humidity ~55% (LD grown). When investigating SD-induced bud set, six representative trees of each RNAi line including WT were moved to a controlled climate chamber (14 h SD conditions, 20°C day and 15°C night temperatures and ~80% humidity) and scored three times per week until all had reached bud-set stage 0.5 (Rohde *et al.*, 2011). After they had all set bud, the trees were moved to 6°C SD conditions for eight weeks of chilling and subsequently LD greenhouse conditions for daily scoring of bud burst (UPOV, 1981).

Seasonal samples were obtained from a 30-year-old Swedish aspen, *Populus tremula* grown under natural conditions in Umeå, Sweden (63°N) (Bohlenius *et al.*, 2006). Once a week, three mature leaves were sampled in the middle of the day and pooled prior to RNA extraction. The average monthly temperature (Sundsvall 1961-1990) and day length conditions were determined from [www.freemeteo.com](http://www.freemeteo.com) and <http://www.dinstartsida.se/solen-ort.asp?id=1854> respectively.

Diurnal LD samples for microarray analysis (Edwards *et al.*, unpublished data) were obtained from four-week-old T89 plants grown in controlled climate chambers, with 18 h light/6 h dark, 18°C day/18°C night temperatures and ~80% humidity. Two random leaves from internodes 8-11 were picked from four trees and pooled every four hours for 48 h, starting at ZT-3. *PtRAV1* was probed three times and *PtRAV2* once on an Affymetrix array, and the resulting data was log normalized. In addition, we analyzed

publicly available continuous light (LL) microarray data from the diurnal webpage <http://diurnal.mocklerlab.org/> (Michael *et al.*, 2008; Mockler *et al.*, 2007). The *Populus trichocarpa* used were three months old and entrained for at least one week prior to sampling in continuous light with 12 h at high (21°C) and 12 h at low (10°C) temperature. Leaves from individual trees were collected every four hours for a total of 48 h.

For the short age series, we sampled LD grown T89 plants approximately one hour before dusk, before and after SD-induced bud set. The first completely unfolded leaves, including petioles, were picked from three different uncut wild-type trees (~2.5 months after potting, height ~120cm) in their first growing season, at dusk about one hour before “lights off” and flash-frozen in liquid nitrogen. A different batch of fresh uncut trees were subjected to a period of dormancy induced by 8 h SD conditions and sampled in their second growth season.

To examine tissue-specific expression in WT, we used fifteen LD grown, six-month-old T89 plants (three biological replicates, five trees/pool) and sampled the apex or shoot tip, 5<sup>th</sup> leaf and 10<sup>th</sup> leaf (counted from the top, excluding the first 3 cm, including petiole). The same trees but at seven months of age were used for sampling phloem and xylem and at eight months of age for sampling fine root or root tips. Phloem and xylem were sampled by removing the bark from the wood and scraping the inside of the bark or the wood to retrieve the phloem and xylem, respectively. To obtain dissected leaf samples, i.e., petiole, mid vein and leaf lamina, we used four LD-grown, four-month-old T89 plants (four biological replicates). Each of the latter plants were cut once and biological samples were obtained from the youngest completely expanded leaf (roughly equal to the 10<sup>th</sup> leaf, top 3cm ignored) from two shoots on the same tree. Thus, each sample was a pool of two leaves from one individual. Phloem and xylem from *PttRAV1&2* RNAi lines and T89 were collected in the early afternoon from the base (30 cm to approximately 45 cm from the ground) of two-month-old trees, grown under LD greenhouse conditions. *PttRAV1&2* RNAi lines were screened to select for the best five of the original 14 lines, using a pool of leaves from one individual/line grown *in vivo* culture under LD (18h/6h, 22°C/18°C) conditions. For comparison, we used three separate pools of WT leaves from T89 grown under the same conditions.

### **RNA extraction, cDNA synthesis and QPCR**

All samples were flash frozen in liquid nitrogen and powdered prior to RNA extraction. For the apex, 5<sup>th</sup> leaf, 10<sup>th</sup> leaf, phloem, xylem and fine root samples, leaves for the *PttRAV1&2* RNAi screen as well as the seasonal sample, RNA was extracted

and DNase treated using the Aurum™ Total RNA mini kit (BIO-RAD). The dissected leaf samples were RNA extracted using TRIZOL (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions and DNase treated using DNasefree (Ambion). RNA integrity was controlled on an agarose gel and concentration was measured using Nanodrop. 500 ng of DNase-treated RNA was used for cDNA synthesis by employing qScript (Quanta) for 60 minutes. The resulting cDNA was diluted prior to QPCR. For the phloem and xylem samples of the *PttRAV1&2* RNAi lines, RNA was extracted using TRIZOL (Invitrogen), DNase treated with DNase I (Fermentas) and cDNA synthesis was performed using qScript (Quanta).

QPCR was performed on a Roche LightCycler480 using LightCycler 480 SYBR green I master (Roche) according to the manufacturer's instructions, 5 µl of diluted cDNA for each 20 µl QPCR reaction and three technical replicates per sample. In cases where a technical replicate gave a deviating melting curve, it was omitted from the calculations. For the tissue-specific expression and short age series, we tested seven reference genes (*UBQ/BU879229* (Brunner *et al.*, 2004), *At4g33380-like/XM\_002301156.1* (Gutierrez *et al.*, 2008), *ACT1/XM\_002298674.1* (Rinne *et al.*, 2011), *TUB/BI139428.1*(GATGCTTACCTTCTCCGTCTTTCCC/GTGACCCCAGACATTGTAGCAGAAA), *50S/XM\_002302828*(CAAAGCCTTCAAAGCCCAAG/GCACTTACGAAGACGCAATG, *TIP41/XM\_002313847.1* (Gutierrez *et al.*, 2008) and *18S/AY652861.1* (Bohlenius *et al.*, 2006) and for the seasonal samples, four reference genes (*At4g88830-like*, *ACT1*, *TIP41* and *18S*) on all samples. The results were analyzed using GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) to identify the best reference genes for that specific set of samples. For the screen of *PttRAV1&2* RNAi lines as well as the phloem and xylem *PttRAV1&2* RNAi and WT samples, we used two reference genes (*At4g33380-like* and *TIP41*).

Mean Ct values for the technical replicates were calculated with the LightCycler480 SW1.5 software using the Absolute Quantification/2<sup>nd</sup> derivative Max method. The normalized delta Ct value was calculated by subtracting the geometric mean of the two or three best reference genes from the gene-specific Ct value. The relative expression was calculated using the delta-delta Ct method ( $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ). We used the following QPCR primers:

	<i>PttRAV1</i>
(ATCGTTGGAGCCTTGTAACATTTT/CCTCATTCCCCCCTAACCT),	<i>PttRAV2</i>
two sets of primers (CCAGCCGGTTCAACCGATTCA/CCCATTACACCCATTTTCCATCCC	
and GGTGTTTGGGGTCAACATC/CGACAAAAGCTCCATTTCTCTC),	<i>PttFT2</i>

(Karlberg *et al.*, 2011; Sasaki *et al.*, 2011; Ruonala *et al.*, 2008). All primers used were tested for optimal annealing temperature using a gradient PCR. At the end of each QPCR run, melting curve analyses were performed to check for specific binding of the

primers. The lack of efficient and specific *PttFT1* primers makes it impossible to draw any clear conclusions about *Populus FT1* expression in the samples used in this study, except that it is very low, which is why we subsequently focused on *PttFT2*.

### Construction and transformation of RAV RNAi vector

A fragment for RNAi was amplified using forward: BamHI (gGGATCCa) GATGCCGTGACTAACTTCAA, reverse: XhoI (gCTCGAGa) TCACTCGGAGTCACAGCTTTC primers on cDNA from *Populus tremula x tremuloides*, incorporated into the pENTR3C entry vector and transferred to pHELLSGATE12 using Gateway technology. The RNAi vector was used to transform hybrid aspen (*Populus tremula x tremuloides*, clone T89) as previously described (Nilsson *et al.*, 1992). The constructed RNAi fragment matched *PttRAV1*, but also had a close resemblance to *PttRAV2*, and was thus expected to decrease levels of both in the transgenic T89 trees.

### Phenotyping of PttRAV1&2 RNAi lines

Height, number of leaves, amount of sylleptic branching and stem diameter at ten internode intervals were measured at four time points with an interval of three days, starting 41 days after potting for five randomly chosen plants of each transgenic line and WT. One month later, (72 days after potting), phenotyping was repeated on all healthy plants (6-11 trees/line), but this time the position of the lowest hairy leaf was also recorded. Unfortunately, some of the previously measured plants had to be excluded from these measurements due to insect problems. In addition the late phenotyping was supplemented with previously unmeasured and healthy plants, making it hard to compare the early and late measurements. Significance was calculated using the two-tailed Student T-test assuming unequal variance and classed as significant \* ( $p \leq 0.1$ ), highly significant \*\* ( $p \leq 0.05$ ) and not significant - ( $p > 0.1$ ).

The base internode was set as the first internode at least 30 cm above soil level. The plant below the base internode and the top 3 cm of the plant were not included in the measurements, except for the total height and height up to the lowest leaf with abaxial trichomes. Internode length was calculated as (total height - 33) divided by (total number of leaves-1). To calculate the normalized diameter, each measurement was normalized by the average diameter of that internode (for all plants) and an average of all measured internodes/line was calculated, thus giving a value based on five (base, 5<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 25<sup>th</sup> and 35<sup>th</sup>) internode measurements/plant and 6-11 plants/line.

The central part of internode fifteen from one 2.5-month-old *PttRAV1&2* RNAi plant per line and five individual WT T89 were fixed in formalin-acetic acid-alcohol, sectioned into 40-50 µm thick slices using a vibratome, stained with safranine / alcian blue and mounted in 50% glycerol. The stem sections were visualized using an AxioCam HRc digital camera (Zeiss) coupled with Axioplan2 imaging software (Zeiss).

## Results

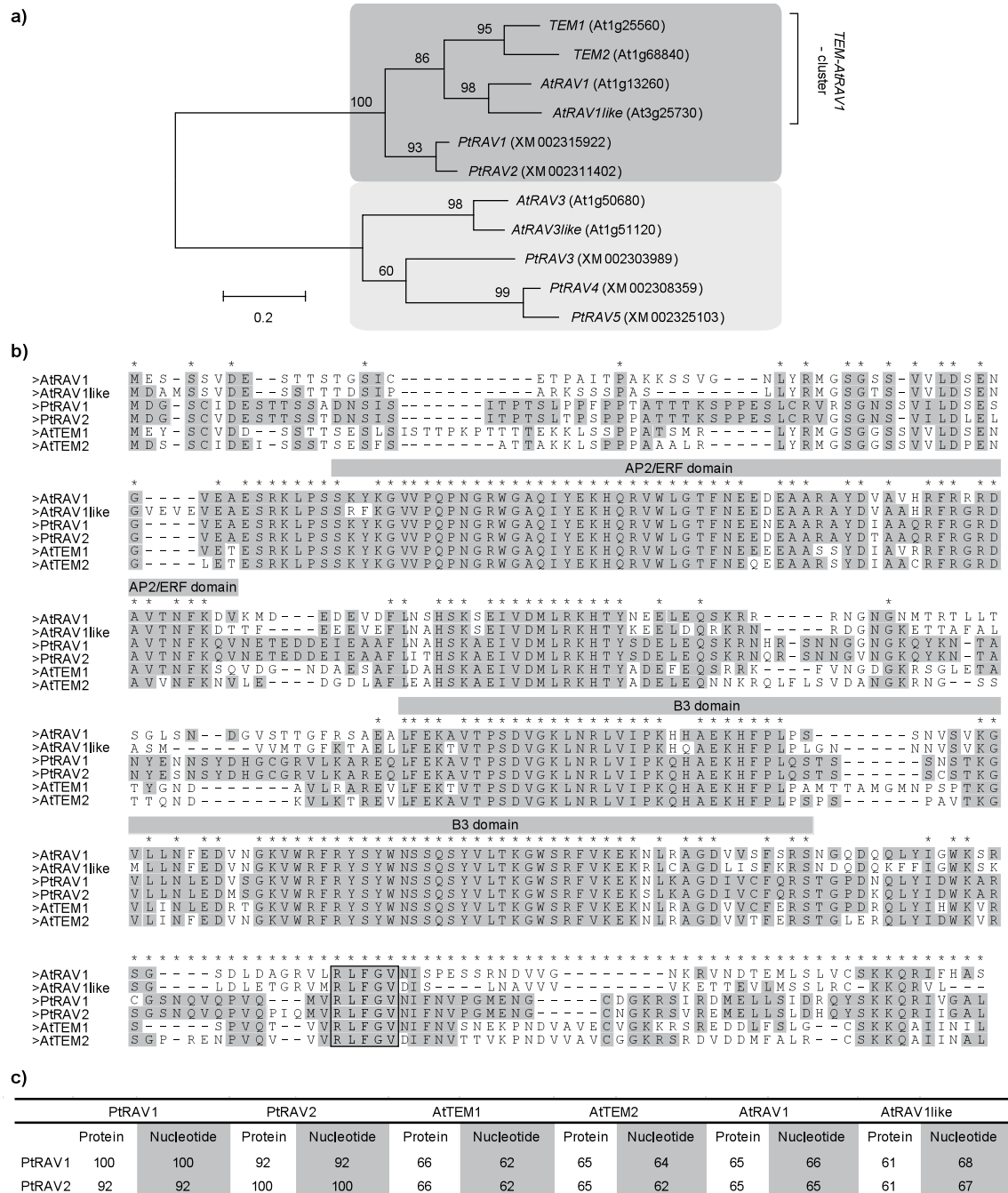
### Identification, phylogeny and sequence analysis of poplar *RAV* genes

Homology searches using BLAST (tblastn on <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1990) against *Populus trichocarpa* identified five genes, *PtRAV1-5*, that had high sequence similarity to the six members of the *RAV* family in *Arabidopsis*. Phylogenetic reconstruction using nucleotide sequences revealed that three of these (*PtRAV3*, *PtRAV4* and *PtRAV5*) cluster with *AtRAV3* and *AtRAV3like* and two (*PtRAV1* and *PtRAV2*) clearly cluster with *AtRAV1*, *AtRAV1like*, *TEM1* and *TEM2* (Fig. 1a).

The nodal support for *PtRAV1* and *PtRAV2* forming a separate sub-clade with *AtRAV1*, *AtRAV1like*, *TEM1* (*AtRAV2like*) and *TEM2* (*AtRAV2*) is very convincing (100%). The probability that the four *Arabidopsis* genes cluster together, excluding *PttRAV1* and *PttRAV2*, is 86%, indicating that the common ancestor of *PtRAV1&2* and *AtTEM1&2* was subjected to one gene duplication in poplar and two in *Arabidopsis*, and that it is not possible to find a *RAV* gene in poplar that is homologous to the *AtTEM* but not the *AtRAV1* genes.

*In silico* analysis of the five PtRAV proteins using the “find conserved domain” option on NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (Marchler-Bauer *et al.*, 2011; Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Marchler-Bauer & Bryant, 2004) showed that all five poplar RAVs have both AP2-like and B3-like DNA binding domains, as do all six *AtRAV/TEMs*. Based on the results from the phylogenetic study (Fig. 1a), we decided to focus on *PtRAV1* and *PtRAV2* since they were the closest homologs of *AtTEM1&2* which have been shown to be of great importance for the floral transition in *Arabidopsis* (Castillejo & Pelaz, 2008). Aligning PtRAV1 and PtRAV2 to their *Arabidopsis* orthologs (Fig. 1b) revealed that both have the C-terminal motif R/KLFGV, which has been proposed to indicate a transcriptional repression function in *Arabidopsis* (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009). Although the R/KLFGV motif is present in *AtTEM1*, *AtTEM2*, *AtRAV1* and *AtRAV1like* as well as *PtRAV1* and *PtRAV2*, it was not found in *AtRAV3*, *AtRAV3like* nor *PtRAV3-5* (data not shown).



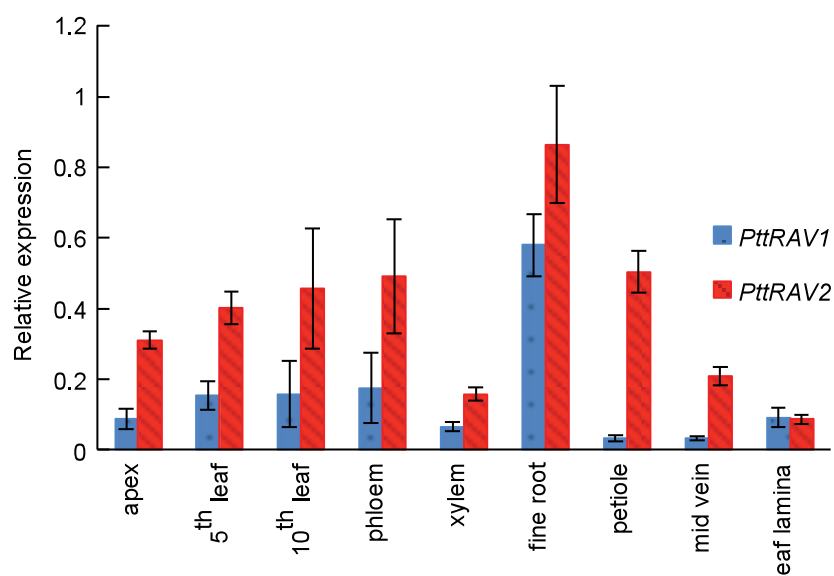


**Figure 1. Phylogenetic reconstruction of the RAV family members in *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa*.** (a) Maximum likelihood tree on nucleotide sequence of all known *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis* RAV genes constructed using MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), Tamura-Nei model with invariant sites (TN93+I) (Nei & Kumar, 2000), complete deletion and tested using 1,000 bootstrap replications. TAIR or gene bank accession numbers are indicated in parenthesis. (b) Protein alignment on AtRAV1 (At1g13260), AtRAV1like (At3g25730), PtRAV1 (XM\_002315922), PtRAV2 (XM\_002311402), AtTEM1 (At1g25560) and AtTEM2 (At1g68840) constructed using MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011), CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Identical amino acids are indicated by \* and all positions where PtRAV1 and PtRAV2 match each other and possibly to one or more of the *Arabidopsis* proteins are shaded. The AP2/ERF and B3 domains are shown above the alignment. The repressor motif RLFQGV (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009) is indicated in the box. (c) Protein and nucleotide identity table of PtRAV1&2 and its closest *Arabidopsis* homologs.

Taken together, the phylogenetic study (Fig. 1a), protein alignment (Fig. 1b) and protein and nucleotide identity table (Fig. 1c) show that it is difficult to conclude whether *PtRAV1&2* are more closely related to *AtTEM1&2* or *AtRAV1/AtRAV1like*. Like all members of the *Arabidopsis* RAV family, *PtRAV1* and *PtRAV2* consist of just one exon, and the protein as well as nucleotide sequence identity between *PtRAV1* and *PtRAV2* is very high (92%) (Fig. 1c), suggesting they have a similar function (Moreno-Cortes *et al.*, 2012).

### **RAV1 and RAV2 expression in *Populus* spp.**

To address whether the poplar *RAV1&2* genes had an expression pattern similar to that of *AtTEM1&2*, we examined their tissue-specific expression in hybrid aspen. High levels of *PttRAV1* and *PttRAV2* transcripts were found in all tissue examined, i.e., apex, leaf at different developmental stages, phloem, xylem, fine root and petiole, but both were expressed the highest in root tissue (Fig. 2). Our expression study also shows that *PttRAV1* and *PttRAV2* transcripts are present in all parts of the leaf: petiole, mid vein and leaf lamina (Fig. 2).



**Figure 2. Tissue-specific expression of *PttRAV1* and *PttRAV2* in WT hybrid aspen.** The graph shows relative expression (Y-axis) of *PttRAV1* and *PttRAV2* in different tissue types (X-axis) of three WT hybrid aspens compared to the geometric mean of three reference genes. Data for the dissected leaves correspond to four pools of two young, completely expanded leaves (approximately 10<sup>th</sup> leaf) from four cut and branched trees. Leaf lamina in this case refers to the remainder of the leaf after the petiole and mid vein have been removed. The error bars show the standard error of the mean of three or four biological replicates.

When comparing the expression in whole leaf, including petiole (5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> leaf), with leaves dissected into three types of tissue, i.e., petiole, mid vein and leaf lamina,

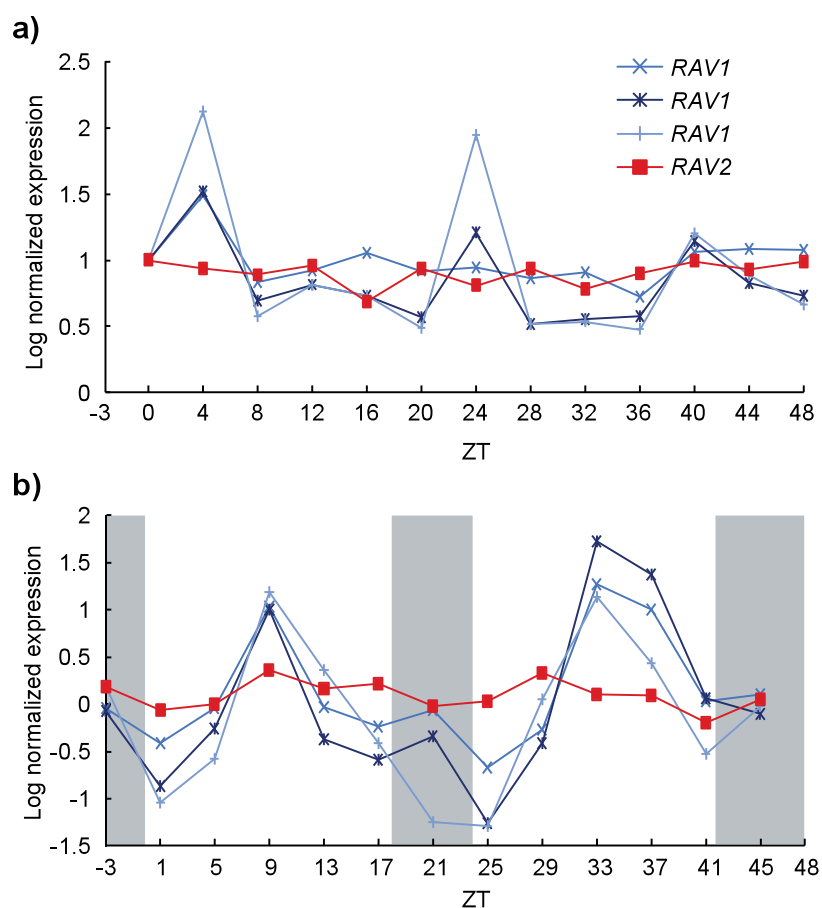
most of the *PttRAV2* expression in whole leaf seems to be located in the vascular tissue of the mid vein and petiole (Fig. 2). In contrast, most of the *PttRAV1* expression found in the whole leaf is located in the green, non-vascular tissue, here called leaf lamina (Fig. 2). In addition, *PttRAV2* seems to be expressed to a higher level than *PttRAV1* in all tested tissues except leaf lamina, where the expression levels were very similar for the two (Fig. 2). Thus, *PttRAV1* and *PttRAV2* expression not only differ by a factor, but also have a different pattern, indicating that the two genes might have different functions despite their high sequence similarity (Fig. 1c).

Given that *Arabidopsis TEM1*, *TEM2* and *RAV1* as well as chestnut *RAV1* exhibit an oscillatory expression pattern (Moreno-Cortes *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008; Fowler *et al.*, 2005), we decided to examine the diurnal expression pattern for *PttRAV1* and *PttRAV2*. This was approached from several directions. Initially, we investigated whether the promoters of the poplar and *Arabidopsis RAV* genes had any potential cis-acting regulatory circadian elements, using <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>. We found that the promoters of all poplar and *Arabidopsis* members of the *RAV* family except *AtRAV3* contained one or several potential binding sites for circadian regulators.

Next, we analyzed publicly available microarray expression data at [http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/diurnal\\_about.html](http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/diurnal_about.html) (Michael *et al.*, 2008; Mockler *et al.*, 2007) for *Populus trichocarpa* grown under LL and cyclic temperature conditions (Fig. 3a) sampled every 4 h for 48 h. Two of the three probes of *PtRAV1* exhibited clear peaks in expression at approximately 20 hour intervals under LL conditions, the first peak appearing at approximately ZT4. *PtRAV2* does not seem to oscillate under these conditions (Fig. 3a). Under LL conditions, it is possible to determine if a gene is clock controlled, but usually not the precise time or duration of the peaks since the circadian clock is not as accurate without daily entrainment of light. Thus, the peaks are typically shifted under LL compared to day/night LD conditions.

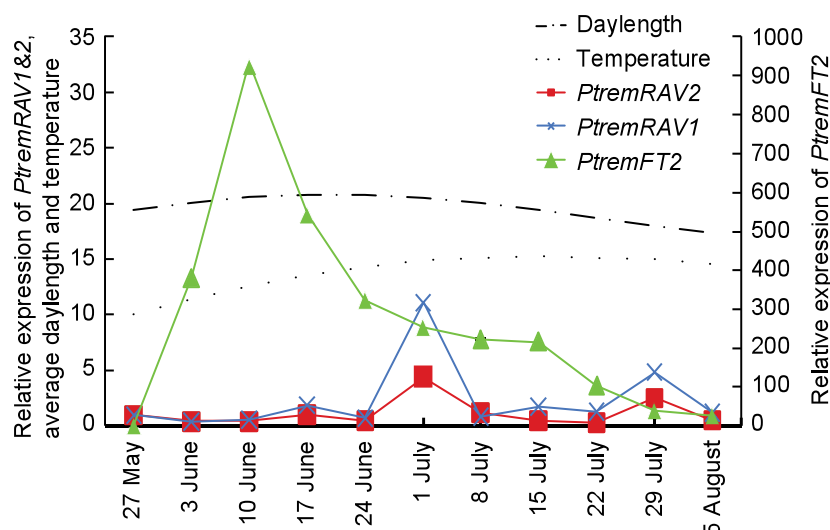
Next we looked at microarray data on T89 grown under 18 h LD and constant temperature conditions (Fig. 3b), sampled every 4 h for a total of 48 h. *PttRAV1* was found to peak at ZT9, whereas *PttRAV2* expression did not show any obvious diurnal pattern (Fig. 3b).

In summary, we found that poplar *RAV2* does not seem to be affected by day/night conditions or the circadian clock (Fig. 3a & b), whereas poplar *RAV1* seems to be diurnally regulated with a peak in expression in the morning (LL, Fig. 3a) or mid-day (LD, Fig. 3b). In addition, data present in the diurnal microarray database ([http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/diurnal\\_about.html](http://diurnal.cgrb.oregonstate.edu/diurnal_about.html)) indicate that *AtRAV1*, but not *AtRAV1like*, *AtRAV3* or *AtRAV3like*, is diurnally expressed under LL conditions.



**Figure 3. Diurnal expression pattern of poplar *RAV1&2* genes.** (a, b) Microarray results: the graphs show normalized relative expression (Y-axis) of (a) *PtRAV1* (blue) and *PtRAV2* (red) and (b) *PttRAV1* (blue) and *PttRAV2* (red) during 48 h (X-axis) under (a) continuous light (LL), 12 h high (21°C) and 12 h low (10°C) temperature or (b) 18 hours LD, constant temperature (18°C) conditions. (a+b) Samples were picked every 4 h for 48 h starting at (a) ZT0 (Michael *et al.*, 2008; Mockler *et al.*, 2007) or (b) ZT3 (Edwards *et al.*, unpublished data). *RAV1* was spotted three times on the array and *RAV2* once. ZT is (a) hours after the lights were switched on after the entrainment or (b) hours after “lights on”.

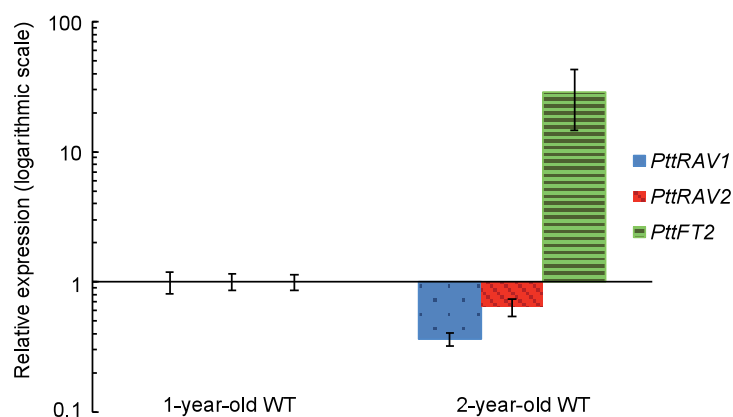
Chestnut *RAV1* expression has been found to increase in stem and bud tissue from early summer through fall to winter (Moreno-Cortes *et al.*, 2012), whereas *GmRAV* increases under SD conditions and is implicated in senescence (Zhao *et al.*, 2008). To estimate the seasonal expression of poplar *RAV* genes, we used leaf samples from *Populus tremula* (*Ptrem*) grown under natural outdoor conditions in Umeå, Sweden at 63°N. As in T89 (Fig. 2), *RAV2* was expressed at overall higher levels than *RAV1* in *Populus tremula*. *PtremRAV1* and *PtremRAV2* exhibited very similar expression patterns, with two peaks during the summer season (late May to mid-August), the first in early July and the second at the end of July (Fig. 4).



**Figure 4. Relative expression of RAV1, RAV2 and FT2 in *Populus tremula* during the summer season.** The graphs show relative expression (Y-axis) of *PtremRAV1* (blue), *PtremRAV2* (red) and *PtremFT2* (green) in WT aspen compared to the geometric mean of three reference genes. No biological replicates were performed in these experiments, and hence no error bars are shown. The 27<sup>th</sup> of May (1<sup>st</sup> time point) was set to one and the other samples were normalized accordingly. Average monthly temperature (Sundsvall 1961-1990) and daylength conditions are included in the diagram.

To study a possible relationship between RAV and FT expression in *Populus*, as observed previously between the TEM genes and FT in *Arabidopsis* (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008), we examined *PtremFT2* levels during the summer season (Fig. 4). The expression of *PtremFT2* peaked in the middle of June and was pronounced until the end of July, when it almost disappeared (Fig. 4). *PtremFT2* levels varied to a greater extent than *PtremRAV1&2* levels. *PtremFT2* expression decreased considerably prior to the large *PtremRAV1&2* peaks in early July and did not increase in mid-July when *PtremRAV1&2* levels became low again. Thus, there was no obvious correlation between *PtremRAV1&2* and *PtremFT2* expression throughout the summer season.

As *AtTEM1* and *AtTEM2* have been found to be down-regulated with age (Castillejo & Pelaz, 2008), we analyzed RAV1&2 expression in poplars of different ages. We found that both *PttRAV1* and *PttRAV2* were down-regulated between the first and second growing season in hybrid aspen (Fig. 5).



**Figure 5. Relative expression (Y-axis) of *PttRAV1* (blue), *PttRAV2* (red) and *PttFT2* (green) in young leaves of *P.tremula x tremuloides* in the first and second growth season compared to the geometric mean of three reference genes. Relative expression of one-year-old WT was set to one and the results for two-year-old WT were normalized accordingly. The error bars show the standard error of the mean of three (2-year-old WT) or four (1-year-old WT) biological replicates.**

*AtTEM1&2* expression is reported to be negatively correlated with *AtFT* before the floral transition in *Arabidopsis* (Castillejo & Pelaz, 2008). Thus we also examined *FT* levels in a short age series and found that *PttFT2* was up-regulated during the examined period (Fig. 5). This indicates a negative correlation between *PttRAV1&2* and *PttFT2* during maturation, as previously observed in *Arabidopsis*. Like in the seasonal experiment (Fig. 4), *FT* levels were found to vary by a considerably larger extent than *RAV1&2* levels.

### Poplar *FTs* are possible targets of *RAV1&2*

Given the unknown nature of the relationship between poplar *RAV1&2* and *FT* in *Populus*, we decided to examine if *PtFT1* and *PtFT2* are potential targets for *RAV1&2* using *in silico* sequence analyses of their promoter sites (supplementary information SM1, SR1, Fig. S1).

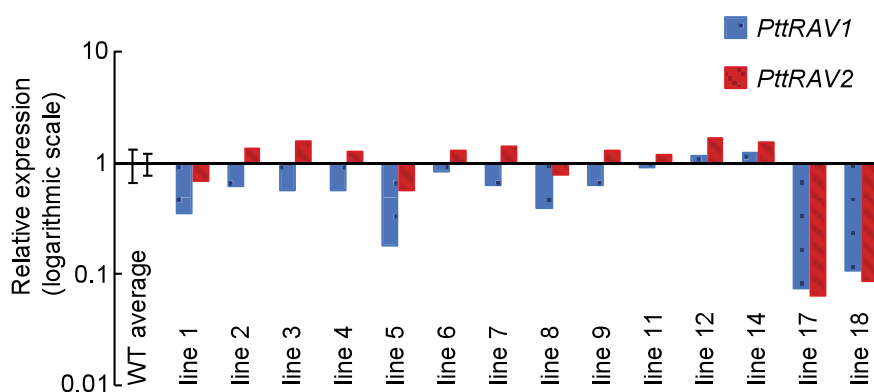
Based on the results, we concluded that both *PtFT1* and *PtFT2* are possible targets of any of the *PtRAV* genes, which were all found to have AP2-like and B3-like DNA binding domains. The fact that *PtFT2* has a conserved number of nucleotides in-between the two binding sites means it is more likely to be a target than *PtFT1*.

The generally very low expression level of *PtFT1* makes it very hard to get acceptable expression data of this gene using RT-QPCR, which is why we focused on *PtFT2*.

## Functional characterization of *PttRAV1&2*

To gain a better understanding of the function of the poplar TEM homologs, we constructed knock-down transgenic plants for phenotyping. The sequence identity on a nucleotide level of *PtRAV1* or *PtRAV2* is as high as 92%, and the phylogenetic data revealed that they are both equally related to *AtTEM1* and *AtTEM2* (Fig. 1). Thus, we speculated that the genes might be functionally redundant, and therefore it would be necessary to decrease the expression of both simultaneously to determine a possible function of *RAV1* and *RAV2* in poplar. Hence, we constructed a RNA interference (RNAi) vector called *PttRAV1&2* RNAi intended to target both genes.

Fourteen transgenic lines were obtained and screened for *RAV* expression using RT-QPCR. We found that the lines were more successful in down-regulating *PttRAV1* than *PttRAV2* (Fig. 6). From the fourteen lines initially produced, five were chosen (line 1, 5, 8, 17 and 18), based on their reduced expression levels of *RAV* (Fig. 6).



**Figure 6. Screen for down-regulation of *PttRAV1* and *PttRAV2* in the *PttRAV1&2* RNAi transgenic lines.** RT-QPCR analysis showing relative expression levels of *PttRAV1* and *PttRAV2* compared to the geometric mean of the reference genes *At4g33380-like* and *TIP41*. The WT average is based on three biological replicates and error bars show the standard error of the mean.

Close monitoring of the early phenotypes of the *PttRAV1&2* RNAi lines was initiated 41 days after potting. There were no obvious phenotypic deviations from the WT T89 plants in these young plants, in agreement with a recent report (Moreno-Cortes *et al.*, 2012).

However, after ten weeks of growth, the *PttRAV1&2* RNAi lines displayed several phenotypic alterations compared to WT (Table 1). In *Populus*, most lateral or axillary buds do not usually burst in the same season in which they are formed, but in our WT T89, there were some buds that grew out sylleptically without passing through a dormant period (Table 1). Surprisingly, ten weeks after potting, the *PttRAV1&2* RNAi



trees showed an increase in sylleptic branching, suggesting that *PttRAV1* and *PttRAV2* might function as repressors of this process. This is in contrast to earlier suggestions based on the phenotype of *CsRAV1* over-expressors in *Populus tremula x alba* (Moreno-Cortes *et al.*, 2012).

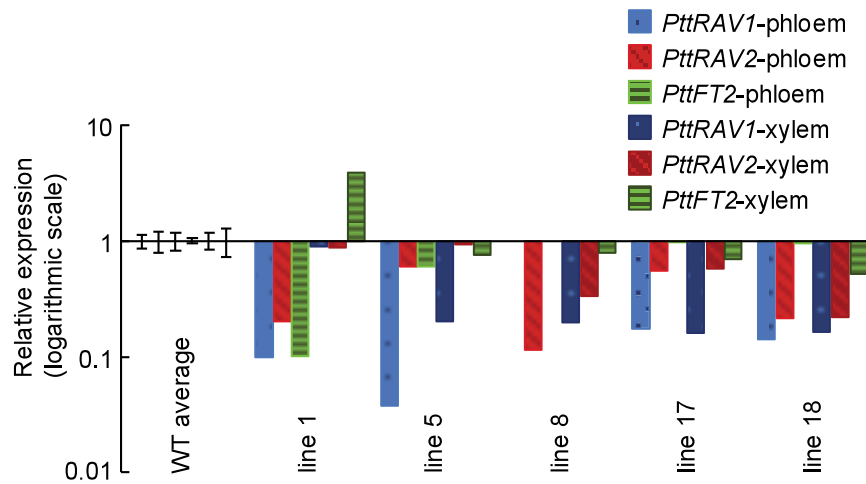
We also found that the number of leaves with abaxial trichomes was significantly higher in the *PttRAV1&2* RNAi lines than in WT (Table 1). In *Arabidopsis*, leaves with abaxial trichomes are not produced during the juvenile stage (Telfer *et al.*, 1997), but in T89 trees only the first-formed leaves showed this characteristic (Table 1). This would again, rather surprisingly, suggest that the *PttRAV1&2* genes may function as repressors of at least this juvenile character.

We saw a trend towards taller trees and wider stem diameters in the *PttRAV1&2* RNAi lines (Table 1), although the large variations within lines meant there were no significant differences between individual lines and the WT. To present the combined diameter result as a single number, we calculated the normalized diameter based on all five diameter measuring points. This value was only significantly larger for line 17, but once again, there was a trend towards larger stem diameter in the mutant lines compared to WT.

As previously mentioned, the *AtTEM1* and *AtTEM2* genes in *Arabidopsis* have been found to function as repressors of *FT* (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008). This could presumably be the case in poplar as well (Fig. 5 & S1). To study this closer, we used the *PttRAV1&2* RNAi lines to investigate what happens to *PttFT2* expression in poplar trees if *RAV* expression is reduced. From an *Arabidopsis* perspective, the relationship between *RAV* and *FT* is most appropriately studied in leaf vascular tissues since that is where *FT* is most abundantly expressed (Yamaguchi *et al.*, 2005; Takada & Goto, 2003). To date, no-one has examined the tissue-specific expression of *FT* in poplar in detail, but it is reasonable to assume that it is also expressed in vascular tissue. Thus, we examined *PttFT2* expression in the xylem and phloem tissue of *PttRAV1&2* RNAi plants compared to WT (Fig. 7).

The down-regulation of both *PttRAV1* and *PttRAV2* was on most occasions more effective in phloem than xylem (Fig. 7), possibly due to higher initial levels in phloem (Fig. 2). There was no clear correlation between reduced levels of *PttRAV* and increased levels of *PttFT2* in either phloem or xylem tissue (Fig. 7) under the studied growth conditions. In most cases, the *PttRAV1&2* RNAi plants exhibited *PttFT2* levels similar to or lower than WT. Only in the xylem of line 1 did we observe higher *PttFT2* levels than in WT.





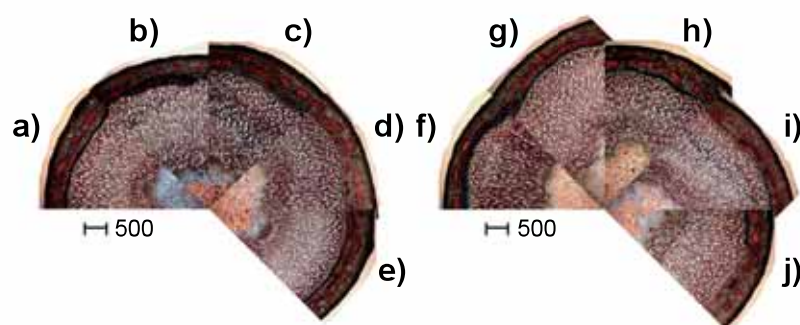
**Figure 7. Relative expression of *PttRAV1*, *PttRAV2* and *PttFT2* in *PttRAV1&2* RNAi lines in phloem and xylem tissue compared to the average of two T89 plants.** The RT-QPCR data are normalized to the geometric mean of two reference genes (*At4g33380* and *TIP41*). WT expression was set to one and the other lines scaled accordingly. *PttRAV1&2* RNAi line 8 is not represented for *PttRAV1*-phloem or *PttFT2*-phloem (due to technical problems, too low cDNA concentration for those genes). Error bars represent the standard error of the mean. Each transgenic line is represented by phloem or xylem tissue from one plant. Technical errors (standard deviation) for *PttFT2* were > 0.5 for 12 of the 16 samples. Therefore, the latter results should be interpreted with caution.

As we found considerable expression of *PttRAV1* and *PttRAV2* in both phloem and xylem (Fig. 2) and a trend towards increased stem diameter in the *PttRAV1&2* RNAi lines (Table 1), we also examined whether decreased levels of *PttRAV* caused any obvious alterations to the anatomy of the stem.

	Total height	Average internode length (cm)	Number of axillary shoots	Height up to lowest leaf with abaxial trichomes (cm)	Stem diameter base internode (mm)	Stem diameter 5ht internode (mm)	Stem diameter 15ht internode (mm)	Stem diameter 25ht internode (mm)	Stem diameter 35ht internode (mm)	Normalized stem diameter
WT (n=6)	171.83 ± 17.13	2.83 ± 0.14	8.12 ± 6.18	34.75 ± 3.83	7.61 ± 1.06	7.41 ± 0.91	6.85 ± 0.92	6.03 ± 1.01	4.79 ± 1.31	0.97 ± 0.16
line 1 (n=9)	177.05 ± 16.47 (-)	2.94 ± 0.21 (-)	15.67 ± 8.77 (*)	44.67 ± 8.38 (**)	7.62 ± 0.41 (-)	7.43 ± 0.52 (-)	6.94 ± 0.69 (-)	6.18 ± 0.67 (-)	5.03 ± 0.77 (-)	0.99 ± 0.10 (-)
line 5 (n=11)	176.00 ± 11.30 (-)	2.87 ± 0.14 (-)	17.18 ± 7.19 (**)	43.77 ± 4.18 (**)	7.77 ± 0.57 (-)	7.54 ± 0.61 (-)	7.08 ± 0.52 (-)	6.40 ± 0.58 (-)	5.33 ± 0.55 (-)	1.01 ± 0.08 (-)
line 8 (n=7)	180.57 ± 5.24 (-)	3.11 ± 0.10 (**)	13.86 ± 4.38 (*)	43.86 ± 3.02 (**)	7.58 ± 0.42 (-)	7.51 ± 0.48 (-)	7.04 ± 0.33 (-)	6.18 ± 0.45 (-)	5.04 ± 0.51 (-)	0.99 ± 0.07 (-)
line 17 (n=6)	176.00 ± 10.52 (-)	2.79 ± 0.11 (-)	20.67 ± 7.63 (**)	49.67 ± 7.12 (**)	7.73 ± 0.49 (-)	7.70 ± 0.35 (-)	7.18 ± 0.26 (-)	6.52 ± 0.34 (-)	5.36 ± 0.42 (-)	1.03 ± 0.06 (*)
line 18 (n=6)	180.75 ± 11.49 (-)	3.04 ± 0.16 (**)	19.67 ± 3.93 (**)	40.00 ± 2.77 (**)	7.77 ± 0.76 (-)	7.64 ± 0.54 (-)	7.32 ± 0.50 (-)	6.39 ± 0.49 (-)	5.12 ± 0.45 (-)	1.02 ± 0.08 (-)

**Table 1. Phenotype measurements of ten-week-old PttRAV1&2 RNAi trees as well as WT hybrid aspen.** Number of biological replicates (*n*) is indicated next to the name. Numbers show the average ± standard deviation and the possible significance level is indicated in parentheses (-; not significant, \*, *p*≤0.1, \*\*, *p*≤0.05). The normalized diameter is a combined average of all five measured internodes per plant and 6-11 trees/line. It is the average of each diameter measurement normalized against the overall average diameter of that internode.

We found no obvious anatomical differences or abnormalities in wood morphology ten weeks after potting (Fig. 8). This result is in agreement with Moreno-Cortes *et al.* (2012), who also found no alterations in the wood of *Populus tremula x alba* (*Pta*) as a result of either over-expression of *CsRAV1* or down-regulation of *PtaRAV1&2*.



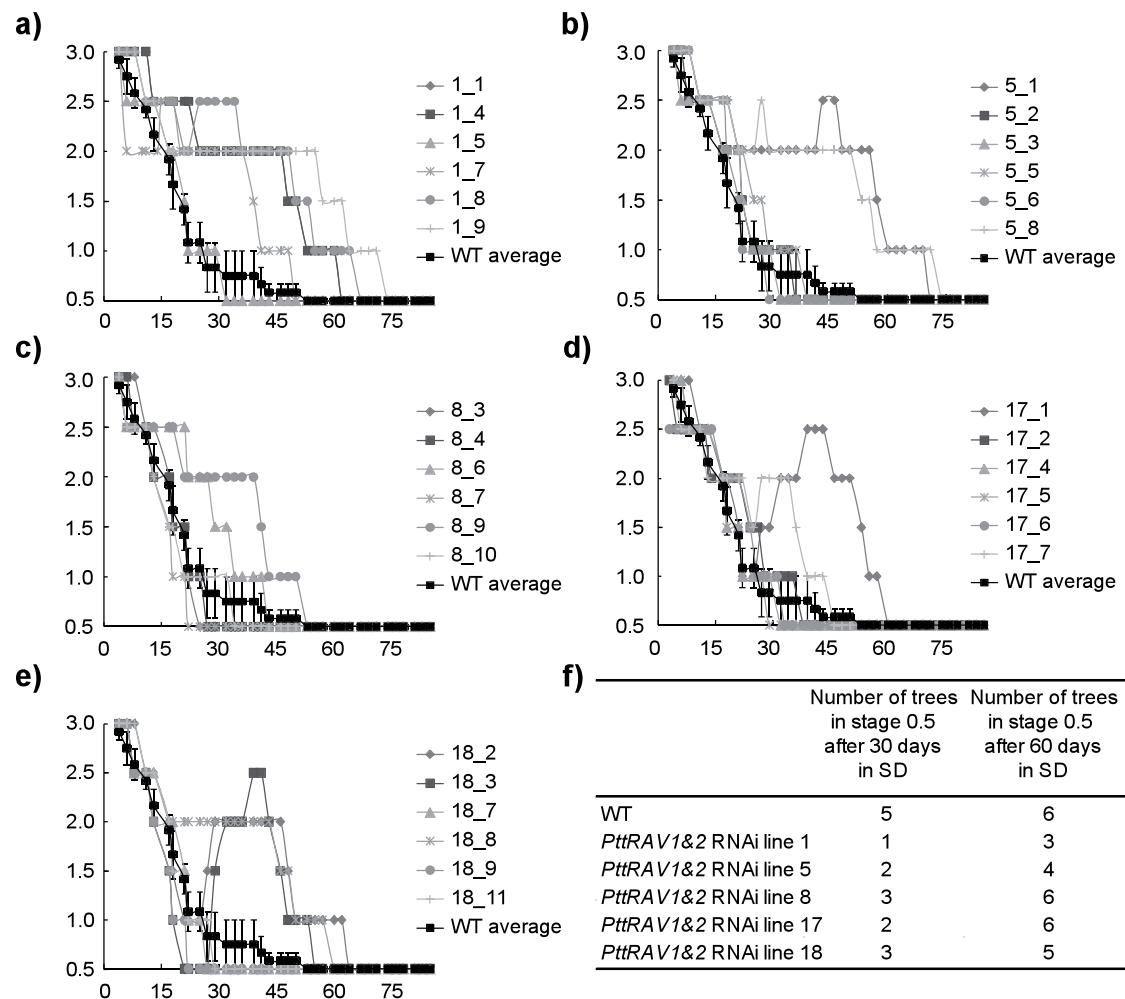
**Figure 8.** Sections of *PttRAV1&2* RNAi and T89 stems. (a-j) 1/8<sup>th</sup> slices of 40-50 μm thick vibratome sections of stem from internode fifteen of trees with similar diameter, stained with safranine / alcian blue and at 4x magnification. (a-e) Vibratome stem sections of *PttRAV1&2* RNAi line 1, 5, 8, 17 and 18, respectively. (f-j) Vibratome stem sections of five individual WT trees.

### Effects on SD-induced growth cessation and bud set

It has been speculated that *RAV1&2* in trees could be involved in controlling seasonal growth cessation and bud set (Moreno-Cortes *et al.*, 2012) since *Arabidopsis* *TEM* affects *FT* expression (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008) and *Populus* *FT* homologs have been found to control this process in poplar (Hsu *et al.*, 2011; Bohlenius *et al.*, 2006). Down-regulation of *AtTEM1* and *AtTEM2* allows plants to accumulate enough *FT* to respond to an inductive photoperiod (Castillejo & Pelaz, 2008), whereas *CsRAV1* has been found to be up-regulated in the fall (Moreno-Cortes *et al.*, 2012). Thus, we wanted to investigate whether down-regulation of *PttRAV1&2* resulted in inhibited SD-induced bud set, as is the case for poplar over-expressing *PtFT1* under the 35S promoter (Bohlenius *et al.*, 2006).

To test this hypothesis, we transferred *PttRAV1&2* RNAi and WT trees from 18 h LD to 14 h SD conditions and scored them continuously for bud set according to Rohde *et al.* (2011) scoring system, which divides the bud set into seven distinct stages from active growth (stage 3) to red-brown bud (stage 0). We terminated the scoring when the buds were closed and only surrounded by completely unfolded leaves (stage 0.5).

*PttRAV1&2* RNAi lines required a longer time period to set bud than WT. This was most pronounced in lines 1 and 5 (Fig. 9a,b), for which only 3 or 4 out of 6 trees reached stage 0.5 after 60 days under SD conditions, whereas 5 out of 6 WT trees had reached that stage after only 30 days of SDs (Fig. 9f). Interestingly, lines 17 (Fig. 9d) and 18 (Fig. 9e) exhibited bud-set reversions, where some trees set bud to stage 1.5 (visible bud for first time), stage 1 (soft open green bud) or even stage 0.5 and then broke bud and produced more leaves prior to setting bud again. This was never seen in the WT controls (Fig. 9). The *PttRAV1&2* RNAi lines 1, 5 and 18 also spent longer time in stage 2 (internode elongation stopped, but no visible bud) and stage 1 than WT (Fig. 9a, b & e), thus prolonging the bud-set process. This suggests that the *RAV1* and *RAV2* genes might have an important role in controlling the bud-set process in trees.



**Figure 9. SD-induced bud set for *PttRAV1&2* RNAi lines. (a-e)** The graphs show the first six stages of bud set (Rohde *et al.*, 2011) (Y-axis) over time (days under 14 h SD) for the top (terminal) bud of six biological replicates (grey) of the five *PttRAV1&2* RNAi (1, 5, 8, 17 and 18) lines, respectively, compared to the average scoring for six individual T89 WT trees (black). Error bars represent the standard error of mean. **(f)** The table summarizes some of

the data present in the graphs. Stage 0.5 corresponds to a closed bud only surrounded by any unfolded leaves.

We also examined bud burst after the dormant *PttRAV2&1* RNAi trees had been subjected to an extended cold treatment and returned to warm temperatures and LD conditions. We found no difference in timing of bud burst between *PttRAV1&2* RNAi lines and WT controls (Fig. S2), suggesting that the *RAV1&2* genes only affect bud phenology and the regulation of bud outgrowth prior to the trees being exposed to winter conditions.

## Discussion

### Phylogenetic studies

We found that two paralogous sequences in poplar, *PtRAV1* and *PtRAV2*, were the closest homologs of *AtTEM1* and *AtTEM2*. However, our phylogenetic study revealed that they were equally related to the *RAV1* and *TEM1/TEM2* groups in *Arabidopsis* (Fig. 1). Moreno-Cortes *et al.* (2012) have suggested that *PtRAV1* and *PtRAV2* are more closely related to *AtTEM1* and *AtTEM2* than to *AtRAV1* and *AtRAV1like* based on phylogenetic analysis at protein level, which showed that poplar *RAV1* and *RAV2* are more likely to group with the *TEM* genes. However, their bootstrap value was only 65%, and thus does not strongly support this grouping. In addition, considering the relatively close relationship between *Populus* and *Arabidopsis* (both being Rosids), a phylogenetic tree based on DNA sequence is preferable since it allows detection of synonymous changes as opposed to analysis at protein level (Barton *et al.*, 2007). According to our analysis based on DNA sequence, it is not possible to conclude whether the poplar *RAV1* and *RAV2* are more closely related to the *RAV1* or *TEM1/TEM2* gene groups in *Arabidopsis*.

The results of the sequence analysis hint towards the function of *PtRAV1* and *PtRAV2*. The presence of AP2/ERF and B3 domains suggest that they are able to bind to DNA, whereas the presence of the C-terminal repressor motif (RLFGV) indicates that they may be transcriptional repressors, just like *AtTEM1* and *AtTEM2* (Ikeda & Ohme-Takagi, 2009; Castillejo & Pelaz, 2008).

### *PttRAV1* and *PttRAV2* expression

*PttRAV1* and *PttRAV2* transcripts were high in all examined tissue, i.e., apex, leaf at different developmental stages, phloem, xylem, root and petiole (Fig. 2). This agrees well with findings on *RAV* family members in other species, which were also found to be expressed in all examined tissues (Moreno-Cortes *et al.*, 2012; Osnato *et*

*al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2008; Kagaya *et al.*, 1999). We found the highest expression of *PttRAV1* and *PttRAV2* in root (Fig. 2), similar to *AtRAV1* and *GmRAV* (Zhao *et al.*, 2008; Kagaya *et al.*, 1999). In leaves, *Arabidopsis AtTEM1* has been shown to be expressed in both the vascular and mesophyll tissue (Castillejo & Pelaz, 2008). This was also true for *PttRAV1* and *PttRAV2*, which were expressed in all parts of the leaf, i.e. petiole, mid vein and leaf lamina (Fig. 2). However, the expression patterns differed considerably between the dissected leaf parts, with *PttRAV2* having its highest expression in vascular tissue, whereas the opposite pattern was found for *PttRAV1* (Fig. 2).

The tissue-specific expression of *PttRAV1* and *PttRAV2* thus does not provide any clues as to whether their function is closer to *AtTEM1&2* or *AtRAV1* and *AtRAV1like* genes but seems to be consistent with both possibilities.

### Diurnal expression

We found that the *Populus RAV1* gene, but not *RAV2*, has pronounced circadian regulation (Fig. 3). This is in agreement with earlier published data on *AtRAV1*, *AtTEM1*, *AtTEM2* and *CsRAV1* expression (Moreno-Cortes *et al.*, 2012; Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008; Fowler *et al.*, 2005). Poplar *RAV1* peak expression varied in the LL (ZT4) and LD (ZT9) experiments (Figs. 3a & b) but appeared to be around morning-noon. This is in contrast to *Arabidopsis AtTEM1* and *AtTEM2*, which have been shown to peak at night (approximately ZT16-ZT18) under LD conditions (Osnato *et al.*, 2012; Castillejo & Pelaz, 2008). However our experiments under LD conditions agree closely with Moreno-Cortes *et al.* (2012), who found that chestnut *RAV1* peaks at approximately ZT6-7 in both LL (leaves) and LD (stem). These data suggest that the diurnal regulation of *RAV* in trees might be conserved but it differs from that in *Arabidopsis*.

### Seasonal expression

The expression pattern detected for *PtremFT2*, i.e., low expression in spring, a large peak in early summer and gradually decreasing expression during the summer (Fig. 4), is similar to that previously reported for *Populus deltoides (Pd) FT2* (Hsu *et al.*, 2006), although *PdFT2* peak expression occurred slightly earlier in the spring, most likely due to the different growth conditions in Mississippi, USA compared to Umeå, Sweden. It is possible that the decrease in *PtremFT2* levels in June (Fig. 4) is related to the increased levels of *RAV1* and *RAV2*. However, if there was direct

inhibition, *FT2* expression would have to be extremely sensitive to increased *RAV* levels since the *RAV* levels are only very marginally increased at the time *FT2* starts to decrease (Fig. 4).

Chestnut *RAV1* expression in buds and stem has been shown to gradually increase from March to December (Moreno-Cortes *et al.*, 2012), but samples were taken at very different time points compared to *PtremRAV1* and *PtremRAV2*. Although *PtremRAV1* and *PtremRAV2* do not seem to exhibit a similar seasonal expression pattern as *CsRAV1*, it is possible that a *CsRAV1* expression peak in July may have been missed since sampling was performed in March, June, September and December (Moreno-Cortes *et al.*, 2012). Similarly, we cannot exclude the possibility that expression of *PtremRAV1* and *PtremRAV2* increases in September to December, as for *CsRAV1*, since our seasonal sampling ended before this period.

The fact that *CsRAV1* was found to be highly induced at 4°C and that its expression peaks in December (Moreno-Cortes *et al.*, 2012) indicates that its putative repressive effect could be very high during the dormant period in chestnut trees. Assuming that this holds for poplar *RAV1* and the fact that *PdFT1* levels have been found to peak during the winter (Hsu *et al.*, 2011), it seems very unlikely that poplar *RAV1* inhibits *FT1* expression, despite the presence of a plausible *RAV* binding site in the *PtFT1* promoter (Fig. S1).

### Age series

We observed developmental down-regulation of *PttRAV1&2* between the first and second growing season of hybrid aspen, which coincided with an increase in *PttFT2* levels (Fig. 5). This agrees well with the observed *TEM* expression pattern over the first weeks of growth in *Arabidopsis* (Castillejo & Pelaz, 2008). *FT2* was previously reported to increase with age in *Populus deltoides* (Hsu *et al.*, 2006) and according to our data, this is also the case for young hybrid aspen (Fig. 5). Based on these expression patterns, we therefore cannot exclude the possibility that *PttRAV1&2* has a role in controlling *Populus FT* expression over time in a similar way to the *TEM* genes in *Arabidopsis*.

### Functional characterization

The overall appearance of young *PttRAV1&2* RNAi trees is very similar to WT, confirming previous results for eight-week-old *PtaRAV1&2* RNAi plants (Moreno-

Cortes *et al.*, 2012). However, a closer look at slightly older plants revealed clear differences between the *PttRAV1&2* RNAi lines and WT T89 ten weeks after potting.

WT hybrid aspen potted on soil usually has trichomes on both stem and the abaxial side of its leaves during the first weeks of growth, indicating a juvenile stage. Whether it is the increased height or the age of the tree that triggers the trichomes to stop forming is unknown, but older plants initially stop producing trichomes on the stem and shortly after stop forming abaxial trichomes on the leaf. This indicates that abaxial trichomes are a sign of extreme juvenility in hybrid aspen. *Arabidopsis AtTEM1/2* RNAi plants have been shown to flower earlier than WT, implying a shorter juvenile phase (Castillejo & Pelaz, 2008). The somewhat increased number of leaves with abaxial trichomes formed by *PttRAV1&2* RNAi plants (Table 1) is thus unexpected since it suggests that the juvenile phase of the *PttRAV1&2* RNAi plants is extended compared to WT. Whether this apparently prolonged early juvenile phenotype has any correlation to flower competence in poplar is not yet known. Contrary to hybrid aspen, abaxial trichomes mark the beginning of the adult phase in *Arabidopsis*, whereas juvenile leaves have no trichomes on the abaxial side (Telfer *et al.*, 1997). In addition to an early flowering phenotype, *tem1tem2* double mutants in *Arabidopsis* are reported to have reduced numbers of leaves lacking abaxial trichomes (Matías-Hernández and Pelaz, unpublished data), indicating that the juvenile vegetative phase is shorter. However, these plants also have a general increase in the number of trichomes, which could mean that the trichomes are not related to juvenility but to a higher GA content or perhaps implies a direct role for TEM in trichome formation. If the latter hypotheses are true, they could explain the observed phenotype in the poplar RNAi lines.

*PttRAV1&2* RNAi lines were found to have significantly higher amount of sylleptic branching than WT (Table 1). Interestingly, similar findings have been reported for *Populus tremula x alba* heterologously over-expressing *CsRAV1* (Moreno-Cortes *et al.*, 2012). It is not uncommon for over-expression of transcription factors to cause loss-of-function phenotypes. One possible mechanism for this is that high levels of the transcription factor may titrate out other cofactors necessary for regulation of transcription, so called squelching, as reviewed by (Zhang, 2003; Ptashne, 1988).

Moreno-Cortes *et al.* (2012) found a slight reduction in the height of plants over-expressing *CsRAV1*, but no significant differences in *PtaRAV1&2* RNAi eight weeks after potting. In *Arabidopsis*, reduced *AtTEM* levels lead to elongated hypocotyls, whereas increased levels result in a dwarf phenotype (Osnato *et al.*, 2012). Similarly, soy bean *RAV* (*GmRAV*) over-expressed in tobacco has been shown to cause dwarfism and reduced root elongation (Zhao *et al.*, 2008). In accordance with the



earlier *CsRAV1*, *GmRAV* and *AtTEM* results, we observed a trend towards increased height for *PttRAV1&2* RNAi plants ten weeks after potting (Table 1). Thus, one could speculate that the difference in height might increase with age. Similarly, we found a slight increase in stem diameter (Table 1) for *PttRAV1&2* RNAi trees, but in agreement with the results of Moreno-Cortes *et al.* (2012), no changes in stem morphology (Fig. 8). It would be interesting to investigate if the *PttRAV1&2* RNAi trees continue to show a trend towards being taller with wider stem diameter than WT (Table 1) as they grow older. In fact, transgenic tobacco plants over-expressing *GmRAV* exhibit no morphological differences compared to WT at an early stage of development, but differences are apparent after four weeks of growth (Zhao *et al.*, 2008).

*FT* expression in poplar has an important role in bud set (Hsu *et al.*, 2011; Bohlenius *et al.*, 2006). *FT* down-regulation is one of the earliest responses to SD treatment in *Populus* (Bohlenius *et al.*, 2006), and ectopic expression of *PtFT1* in poplar effectively delays or completely inhibits (depending on the efficiency of the construct) bud-set induction under SD conditions (Bohlenius *et al.*, 2006). Previous data has indicated that *RAV1* and *RAV2* genes may be induced under both SDs and low temperatures. *AtRAV1*, *CsRAV1*, *PtaRAV1*, *PtaRAV2*, *AtTEM1*, and possibly *AtTEM2*, are known to be up-regulated in response to low temperature (Moreno-Cortes *et al.*, 2012; Fowler *et al.*, 2005; Fowler & Thomashow, 2002) and (Marín-González & Pelaz, unpublished data). In addition, *Populus RAV2* is reported to be at least four-fold induced within the first two weeks under SD conditions (Ruttink *et al.*, 2007). In chestnut trees, *CsRAV1* expression was found to be increased by about two-fold in September and about five-fold in December compared with March or June levels in both stem and bud (Moreno-Cortes *et al.*, 2012). Assuming that *PttRAV1* and/or *PttRAV2* actually inhibit *FT* expression in hybrid aspen, one would expect delayed bud set in the *PttRAV1&2* RNAi plants. However the *PttRAV1&2* RNAi trees were not delayed in bud set but interestingly exhibited a prolonged bud set and several cases of bud-set reversions (Fig. 6). This suggests that the *PttRAV1* and *PttRAV2* genes may be involved in maintaining early bud dormancy. This could also explain the increased sylleptic branching in the *PttRAV1&2* RNAi trees. Careful analysis of transcript levels of *PttRAV1* and *PttRAV2* as well as *PttFT2* during the shift from LDs to SDs would help to clarify whether the prolonged bud set is caused by higher *FT* levels in the *PttRAV1&2* RNAi trees.

To summarize, it is still unclear whether poplar *RAV1* and *RAV2* have redundant functions or not. Phylogenetic and sequence analyses (Fig. 1), as well as seasonal (Fig. 4) and age-related (Fig. 5) expression patterns, suggest they do, whereas their

differentiated expression patterns in leaf tissue (Fig. 2) and during diurnal conditions (Fig. 3) suggest the opposite. The individual roles of the *PttRAV1* and *PttRAV2* genes need to be clarified in gene-specific knock-down mutants, perhaps using artificial micro RNAs.

Our experimental data neither verifies nor contradicts the hypothesis that poplar *RAV1* and *RAV2* might be inhibitors of *FT*. *In silico* analysis of the binding sites shows that they are potential inhibitors of both *PtFT1* and *PtFT2* (Fig. S1). The observed negative correlation between poplar *RAV* and *FT2* expression with age (Fig. 5) is consistent with this. However, the lack of differences in *PtFT2* expression in *PttRAV1&2* RNAi lines compared to WT (Fig. 7) as well as the seasonal data (Fig. 4) suggests that there is no direct link between *RAV1&2* and *FT2* expression. It is worth noting that the failure to detect up-regulation of *FT2* expression in stem vascular tissue of the *PttRAV1&2* RNAi lines (Fig. 7) might be caused by very limited *FT2* promoter activity in this tissue. To gain a better understanding of their possible *FT2*-repressing function, it is important to investigate whether *PttRAV1* and *PttRAV2* are able to bind to the *PtFT2* promoter in a similar way as the TEM proteins bind to the *Arabidopsis FT* promoter.

Taken together, our data show that there are no clear TEM orthologs in *Populus* trees. The *PttRAV1* and *PttRAV2* genes appear to have an important role, mainly in the regulation of bud set and early bud dormancy. This is manifested as bud-set reversions after SD treatments and increased sylleptic branching. These effects of the *RAV1&2* genes appear primarily in the bud-set process since we found no effects of the *RAV1&2* genes during bud-break after the trees had been subjected to winter conditions (Fig. S2). It is still possible, but remains to be proven, that the *RAV1&2* genes, like the *TEM* genes in *Arabidopsis*, have a role as *FT* repressors during juvenile stages of growth.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Melis Kucukoglu and Prof. Stefan Jansson for providing the tissue and seasonal samples used in this study. We would also like to thank Dr. Maria Eriksson and Dr. Kieron Edwards for providing microarray data ahead of print. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN BFU2009-08325) and the Swedish Research Council (VR), the Knowledge Foundation (KK-stiftelsen), the Swedish Governmental Agency for Innovation Systems (VINNOVA). S.P.'s research group has been recognized as a Consolidated Research Group by the Catalan Government (2009

SGR 697) and the CRAG is supported by a Spanish Ministry grant within the CONSOLIDER Program (CSD2007-00036).

**Supplementary information**

**SM1:** Poplar *FTs* are possible targets for RAV1&2.

**SR1:** Poplar *FTs* are possible targets for RAV1&2.

**Fig.S1:** Poplar *FTs* are possible targets for RAV1&2.

**Fig.S2:** Bud burst in *PttRAV1&2* RNAi and WT trees.

## References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3), 403-410.
- Barton, N., Briggs, D., Eisen, J., Godstein, D. & Patel, N. (2007). *Evolution*: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-087969684-9.
- Bergonzi, S. & Albani, M.C. (2011). Reproductive competence from an annual and a perennial perspective. *Journal of Experimental Botany* 62(13), 4415-4422.
- Bohlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A.M., Jansson, S., Strauss, S.H. & Nilsson, O. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312(5776), 1040-1043.
- Brunner, A.M., Yakovlev, I.A. & Strauss, S.H. (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology* 4, 14.
- Castillejo, C. & Pelaz, S. (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology* 18(17), 1338-1343.
- Fowler, S. & Thomashow, M.F. (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* 14(8), 1675-1690.
- Fowler, S.G., Cook, D. & Thomashow, M.E. (2005). Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiology* 137(3), 961-968.
- Gutierrez, L., Bussell, J.D., Pacurar, D.I., Schwambach, J., Pacurar, M. & Bellini, C. (2009). Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell* 21(10), 3119-3132.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guenin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J.-F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerineau, F., Bellini, C. & Van Wuytswinkel, O. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal* 6(6), 609-618.
- Hsu, C.-Y., Adams, J.P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S.H., Drnevich, J., Vandervelde, L., Ellis, J.D., Rice, B.M., Wickett, N., Gunter, L.E., Tuskan, G.A., Brunner, A.M., Page, G.P., Barakat, A., Carlson, J.E., dePamphilis, C.W., Luthe, D.S. & Yuceer, C. (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(26), 10756-10761.
- Hsu, C.Y., Liu, Y.X., Luthe, D.S. & Yuceer, C. (2006). Poplar FT2 shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18(8), 1846-1861.
- Ikeda, M. & Ohme-Takagi, M. (2009). A novel group of transcriptional repressors in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 50(5), 970-975.
- 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.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J. & Weigel, D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286(5446), 1962-1965.
- Karlberg, A., Bako, L. & Bhalerao, R.P. (2011). Short day-mediated cessation of growth requires the downregulation of AINTEGUMENTALIKE1 transcription factor in hybrid aspen. *PLoS Genetics* 7(11).
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. & Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* 286(5446), 1960-1962.
- Li, G.Q. & Moriyama, E.N. (2004). Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in Bioinformatics* 5(4), 378-388.

- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N. & Bryant, S.H. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research* 37, D205-D210.
- Marchler-Bauer, A. & Bryant, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research* 32, W327-W331.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C. & Bryant, S.H. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* 39, D225-D229.
- Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., Priest, H.D., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S.A. & Chory, J. (2008). Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genetics* 4(2).
- Mockler, T.C., Michael, T.P., Priest, H.D., Shen, R., Sullivan, C.M., Givan, S.A., McEntee, C., Kay, S.A. & Chory, J. (2007). The diurnal project: Diurnal and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 72, 353-363.
- Moreno-Cortes, A., Hernandez-Verdeja, T., Sanchez-Jimenez, P., Gonzalez-Melendi, P., Aragoncillo, C. & Allona, I. (2012). CsRAV1 induces sylleptic branching in hybrid poplar. *New Phytologist* 194(1), 83-90.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. (Molecular evolution and phylogenetics. ISBN 0-19-513585-7.
- Nilsson, O., Alden, T., Sitbon, F., Little, C.H.A., Chalupa, V., Sandberg, G. & Olsson, O. (1992). Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promoter-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging. *Transgenic Research* 1(5), 209-220.
- Osnato, M., Castillejo, C., Matias-Hernandez, L. & Pelaz, S. (2012). TEMPRANILLO genes link photoperiod and gibberellin pathways to control flowering in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 3(808).
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335(6192), 683-9.
- Rinne, P.L.H., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Kangasjarvi, J. & van der Schoot, C. (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA-inducible 1,3-beta-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell* 23(1), 130-146.
- Rohde, A., Storme, V., Jorge, V., Gaudet, M., Vitacolonna, N., Fabbrini, F., Ruttink, T., Zaina, G., Marron, N., Dillen, S., Steenackers, M., Sabatti, M., Morgante, M., Boerjan, W. & Bastien, C. (2011). Bud set in poplar - genetic dissection of a complex trait in natural and hybrid populations. *New Phytologist* 189(1), 106-121.
- Ruonala, R., Rinne, P.L.H., Kangasjarvi, J. & van der Schoot, C. (2008). CENL1 expression in the rib meristem affects stem elongation and the transition to dormancy in *Populus*. *Plant Cell* 20(1), 59-74.
- Ruttink, T., Arend, M., Morreel, K., Storme, V., Rombauts, S., Fromm, J., Bhalerao, R.P., Boerjan, W. & Rohde, A. (2007). A molecular timetable for apical bud formation and dormancy induction in poplar. *Plant Cell* 19(8), 2370-2390.
- Sasaki, R., Yamane, H., Ooka, T., Jotatsu, H., Kitamura, Y., Akagi, T. & Tao, R. (2011). Functional and expressional analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot. *Plant Physiology* 157(1), 485-497.
- Takada, S. & Goto, K. (2003). TERMINAL FLOWER2, an *Arabidopsis* homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING

- LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* 15(12), 2856-2865.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28(10), 2731-2739.
- 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.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22), 4673-4680.
- Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T. & Hammond, S.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & Development* 20(16), 2202-2207.
- UPOV (1981). *Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Homogeneity and Stability - Populus*. Geneva: International Union for the Protection of New Varieties of Plants
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7).
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M. & Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant and Cell Physiology* 46(8), 1175-1189.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tatenno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Motoaki, S., Shinozaki, K. & Yokoyama, S. (2004). Solution structure of the B3 DNA binding domain of the *Arabidopsis* cold-responsive transcription factor RAV1. *Plant Cell* 16(12), 3448-3459.
- Zhang, J.Z. (2003). Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 6(5), 430-440.
- Zhao, L., Luo, Q., Yang, C., Han, Y. & Li, W. (2008). A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean. *Planta* 227(6), 1389-1399.

## Supplementary information

### Methods

#### SM1: Poplar *FTs* are possible targets for RAV1&2

In *Arabidopsis*, two sites (usually 5'-CAACA-3'/AP2-like followed by a 5'-CACCTG-3'/B3-like) have been identified as the DNA recognition sites of AtRAV1 (Kagaya *et al.*, 1999) and both these motifs have been found in the 5'UTR of *AtFT*. It has been suggested that AtTEM1&2 may repress *FT* directly, and this was later experimentally confirmed for AtTEM1 (Castillejo & Pelaz, 2008). The two DNA-binding domains can function separately but the affinity and specificity is enhanced if they are used together (Kagaya *et al.*, 1999). In agreement with this, Castillejo & Pelaz, (2008) showed that in *Arabidopsis* both the AP2-like and B3-like binding sites need to be intact for optimal DNA binding of *AtTEM1*, whereas mutations in either AP2 or B3 severely decrease the binding efficiency.

To investigate whether PtRAV1&2 binds to *PtFT*, we analyzed the promoter sequence of *PtFT1* and *PtFT2* to identify possible binding sites for RAV (Fig. S1). Hypothesizing that the AtRAV1 consensus sequence applies for poplar RAV1&2 binding to *FT1* and *FT2*, we searched the *PtFT1* and *PtFT2* promoters for an AP2-like-B3-like domain, i.e., **C(A/C/G)(A/C/G)CA-N<sub>2-9</sub>-(C/A/T/G)(A/T/G/C)(C/T/G/A)CTG** (Kagaya *et al.*, 1999) situated approximately 17 nucleotides from the start codon.

### Results

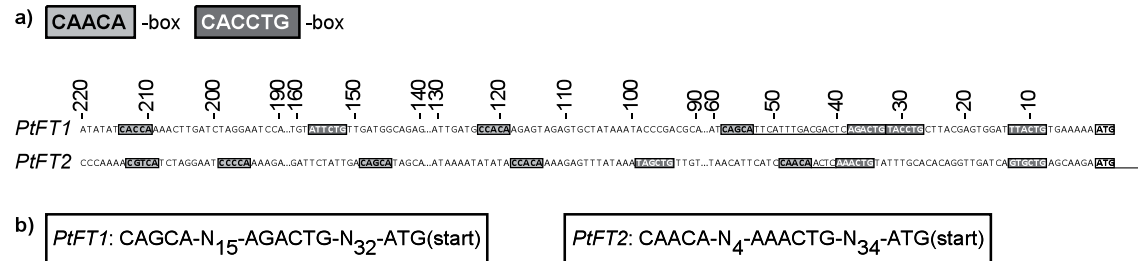
#### SR1: Poplar *FTs* are possible targets for RAV1&2

The most conserved variant of the CAACA/AP2-like site was only found in the promoter of *PtFT2* and the most conserved variant of CACCTG/B3-like sites was neither in the close proximity to the ATG start codon in *PtFT1* nor *PtFT2*, but several variants of each with the substitutions suggested by Kagaya *et al.* (1999) were present (Fig. S1a). Our results show that on a sequence level, both *PtFT1* and *PtFT2* are putative targets of RAV (Fig. S1). The most likely binding site in *PtFT1* has a modified CAACA/AP2-like site (CAGCA 54bp upstream of ATG) followed by a modified CACCTG/B3-like site (AGACTG 32bp upstream of ATG), separated by 15 nucleotides (Fig. S1b). The most likely binding site in *PtFT2* has a perfect CAACA/AP2-like site (44bp upstream of ATG) followed by a modified CACCTG/B3-like site (AAACTG 34bp upstream of ATG) separated by four nucleotides (Fig. S1b). In contrast to *PtFT2*, the number of nucleotides in-between the two boxes do not follow the consensus in *Arabidopsis* of two to nine nucleotides in the *PtFT1* promoter, but instead the shortest distance between the sites is 16 nucleotides. In both *PtFT1*

and *PtFT2*, the target site is further away from the start codon than in *Arabidopsis FT*, where it is located only 17 nucleotides from the start codon.

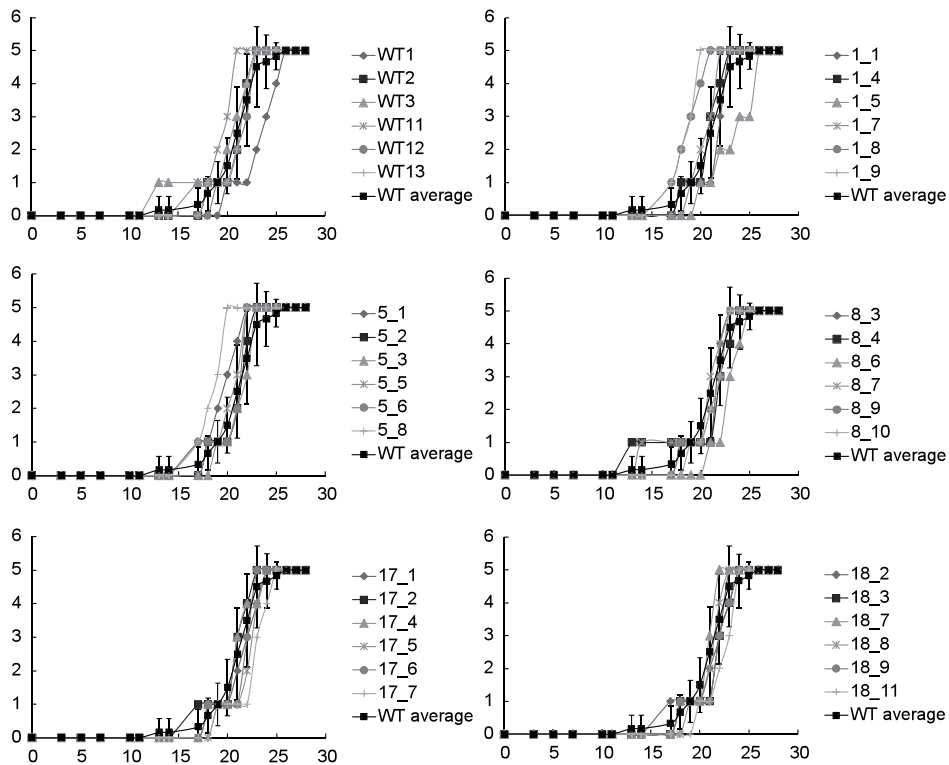
**Figures**

**Fig. S1: Poplar FTs are possible targets for RAV1&2**



**Figure S1.** Potential binding sites for PtRAV in the *PtFT1* and *PtFT2* promoters. **(a)** The existence of AP2-like (CAACA-box) and B3-like (CACCTG-box) binding sites in *PtFT1* and *PtFT2* promoter 220 nucleotides upstream of the ATG start codon. AP2-like domains are boxed and light gray, while B3-like domains are boxed and dark gray. The numbers indicate distance in number of nucleotides from the ATG start codon. The coding sequence is represented by a boxed ATG followed by an empty line. The best hypothetical combined AP2-B3 binding sites in *PtFT1* and *PtFT2* are underlined in **(a)** and enlarged in **(b)**.

**Fig. S2: Bud burst in *PttRAV1&2* RNAi and WT trees.**



**Figure S2.** Bud burst under long days after a period of dormancy in *PttRAV1&2* RNAi and wild type T89 trees. The graphs show the five stages of bud burst (UPOV, 1981) (Y-axis) over time (days after move back to long days) for the top bud of six biological replicates of WT and the five *PttRAV1&2* RNAi (1, 5, 8, 17 and 18) lines, respectively. The average for WT is included in all graphs in black with error bars representing standard deviation.



## CONCLUSIONES

La conclusión general que podemos extraer de este capítulo es que los genes *PtRAV1* y *PtRAV2* están implicados en la inhibición de ramas silépticas y controlan las fases iniciales de la formación de las yemas durmientes, promoviendo su mantenimiento.

Acorde con todos los resultados obtenidos en este trabajo experimental, también podemos concluir que:

1. Los genes *PtRAV1* y *PtRAV2* de *Populus trichocarpa* son los homólogos más cercanos al clado formado por *AtRAV1/AtRAV1like* y *AtTEM1/AtTEM2* de *Arabidopsis thaliana*.
2. El mRNA de *PttRAV1* y *PttRAV2* se detecta en varios tejidos: ápices, hojas (mesófilo, tejido vascular y pecíolo) y raíces. En ambos casos, se detecta una mayor expresión en las raíces.
3. *PttRAV1*, pero no *PttRAV2*, muestra una regulación circadiana y en LD su pico de expresión se produce en el periodo de luz (por la mañana), a diferencia del patrón de expresión de los genes *AtTEM*, que presentan un pico de expresión nocturna.
4. La expresión estacional de *PtremRAV1* y *PtremRAV2* es opuesta a la de *PtremFT2*, y se produce a mediados de la estación de verano.
5. La expresión de *PttRAV1* y *PttRAV2* decae entre el primer y el segundo año de desarrollo, al contrario de *PttFT2*.
7. Las plantas *PttRAV1/2 RNAi* presentan un mayor número de hojas con tricomas en la cara abaxial de las hojas, lo que se relaciona con una etapa juvenil extendida. El fenotipo de estas plantas es similar al de las plantas silvestres durante la etapa juvenil pero difiere de éstas a partir de las 10 semanas después de la siembra.
8. Las plantas *PttRAV1/2 RNAi* presentan un mayor número de ramas silépticas en comparación con las plantas silvestres y requieren de más tiempo para formar las yemas durmientes.

**LITERATURA CITADA**

- Bergonzi, S., & Albani, M. C. (2011). Reproductive competence from an annual and a perennial perspective. *Journal of Experimental Botany*, *62*(13), 4415–4422.
- Boes, T. K., & Strauss, S. H. (1994). Floral phenology and morphology of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Salicaceae). *American Journal of Botany*, *81*(5), 562–567.
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., & Nilsson, O. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, *312*(5776), 1040–1043.
- Critchfield, W. B. (1960). Leaf dimorphism in *Populus trichocarpa*. *American Journal of Botany*, *47*(8), 699–711.
- Eriksson, M. E., & Webb, A. R. (2011). Plant cell responses to cold are all about timing. *Current Opinion in Plant Biology*, *14*(6), 731–737.
- González-Schain, N. D., Díaz-Mendoza, M., Zurczak, M., & Suárez-López, P. (2012). Potato CONSTANS is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner. *The Plant Journal*, *70*(4), 678–690.
- Heide, O., & Prestrud, A. (2005). Low temperature, but not photoperiod, controls growth cessation and dormancy induction and release in apple and pear. *Tree Physiology*, *25*(1), 109–114.
- Hsu, C., Liu, Y., Luthe, D. S., & Yuceer, C. (2006). Poplar FT2 Shortens the Juvenile Phase and Promotes Seasonal Flowering. *The Plant Cell*, *18*, 1846–1861.
- Hsu, C., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., ... Yuceer, C. (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(26), 10756–10761.
- Hsu, C., Adams, J. P., No, K., Liang, H., Meilan, R., Pechanova, O., ... Yuceer, C. (2012). Overexpression of CONSTANS homologs CO1 and CO2 fails to alter normal reproductive onset and fall bud set in woody perennial poplar. *PLoS One*, *7*(9), e45448.
- Huijser, P., & Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, *138*(19), 4117–29.
- Ibáñez, C., Kozarewa, I., Johansson, M., Ogren, E., Rohde, A., & Eriksson, M. E. (2010). Circadian clock components regulate entry and affect exit of seasonal dormancy as well as winter hardiness in *Populus* trees. *Plant physiology*, *153*(4), 1823–1833.
- Jansson, S., & Douglas, C. J. (2007). *Populus*: a model system for plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 435–458.
- 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.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., & Yano, M. (2002). Hd3a, a rice ortholog of the *Arabidopsis* FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant Cell Physiology*, *43*(10), 1096–1105.
- Moreno-Cortés, A., Hernández-Verdeja, T., Sánchez-Jiménez, P., González-Melendi, P., Aragoncillo, C., & Allona, I. (2012). CsRAV1 induces sylleptic branching in hybrid poplar. *New Phytologist*, *192*, 83–90.
- Petterle, A., Karlberg, A., & Bhalerao, R. P. (2013). Daylength mediated control of seasonal growth patterns in perennial trees. *Current opinion in plant biology*, *16*(3), 301–306.
- Pin, P., & Nilsson, O. (2012). The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development. *Plant Cell and Environment*, *35*, 1742–1755.
- Poethig, R. S. (2010). The Past, present, and future of vegetative phase change. *Plant Physiology*, *154*, 541–544.
- Rohde, A., Bastien, C., & Boerjan, W. (2011). Temperature signals contribute to the timing of photoperiodic growth cessation and bud set in poplar. *Tree Physiology*, *31*, 472–482.

- 
- Rohde, A., & Bhalerao, R. P. (2007). Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science*, *12*(5), 217–223.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, *410*, 1116–1120.
- Wang, J.-W., Park, M. Y., Wang, L.-J., Koo, Y., Chen, X.-Y., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2011). miRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genetics*, *7*(2), e1002012.
- Wigge, P. a, Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, *309*(5737), 1056–1059.
- Wu, R., & Hinckley, T. M. (2001). Phenotypic plasticity of sylleptic branching: genetic design of tree architecture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *20*(5), 467–485.
- Yano, M., Katayose, Y., Ashikari, M., Yamanouchi, U., Monna, L., Fuse, T., ... Sasaki, T. (2000). Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene CONSTANS. *The Plant Cell*, *12*(12), 2473–2484.

## DISCUSIÓN GENERAL

---

### 1. Los genes TEM conectan la información de diferentes rutas de control de la floración

El conocimiento acumulado sobre los genes *TEMPRANILLO (TEM)* ha ido en aumento desde que se publicara su función como represores de la floración en la ruta del fotoperiodo (Castillejo & Pelaz, 2008) y de las hormonas giberelinas (Osnato et al., 2012). Sin embargo, a pesar de la reciente publicación de nuevos datos sobre su relación con otros componentes de las rutas del fotoperiodo, como GI (Sawa & Kay, 2011) o de la temperatura, como FLC, SVP y SOC1 (Deng et al., 2011; Tao et al., 2012), o el represor floral de la familia AP2, SMZ (Mathieu et al., 2009), siguen siendo muchas las cuestiones que quedan pendientes, y resolverlas permitirá alcanzar un conocimiento más completo de la regulación de la inducción floral.

El trabajo que hemos llevado a cabo ha intentado abrir nuevas vías de estudio en el conocimiento de los genes *TEM*, y algunos de los resultados más relevantes que podemos extraer se centran en su participación como reguladores de la floración en las diferentes rutas estudiadas, de forma que integran la información ambiental y endógena para regular la floración en condiciones de LD y SD.

Los resultados presentados en el capítulo 1 de esta tesis han abierto una interesante línea de trabajo en la regulación de las transiciones de fase del desarrollo por la edad, con el módulo miR156/SPL9/miR172 como eje central. La función de los genes *TEM* como reguladores directos de *SPL9* (Fig. 15 y 16) y *MIR172* (Fig. 18 y 19) asegura la correcta y estricta regulación de las transiciones, al mantener, junto a miR156, una fase juvenil suficientemente larga y retrasando la transición a la fase adulta y con ello la floración (Wang et al., 2009; Wu & Poethig, 2006). De esta manera, TEM1 regula todos los pasos de la ruta miR156, y al menos en dos de ellos de forma directa.

La acción de miR156 y TEM1 sería complementaria y a la vez dependiente. La ausencia de miR156 en etapas tempranas del desarrollo provoca la ausencia de fase juvenil (Wu et al., 2009), mientras que en los mutantes *tem1 tem2* sigue existiendo un periodo juvenil, aunque más corto que el del tipo silvestre (Tabla 7). Esto sugiere que miR156 tiene un efecto mayor sobre el control de la duración de la etapa juvenil que los genes *TEM* aunque ambos regulan a algunos genes diana comunes, como *SPL9* y *MIR172*, directa e indirectamente. También es probable que otros genes diana de miR156, que pueden no estar regulados por los *TEM*, participen en el control de la duración de la etapa juvenil.

En relación con el control de la floración por la edad, parece que los genes *TEM* serían necesarios para miR156, el cual parece requerir la presencia de TEM1 para retrasar la floración en condiciones de LD (Fig. 23 y 24). Estos resultados sugieren que TEM también

conecta la información endógena para regular el inicio de la floración. La continuidad de este proyecto esclarecerá la importancia de los genes *TEM* en la ruta de la edad.

Por otra parte, en el capítulo 2, el estudio de las rutas de la luz y la temperatura nos ha permitido establecer que los genes *TEM* están regulados por estas señales ambientales a través de algunos componentes de dichas rutas.

En concreto, en el caso de la regulación por la luz, la transcripción de los genes *TEM* parece ser controlada por los factores de transcripción *VOZ1/VOZ2* a través de su regulación transcripcional (Fig. 55) y proteica (no mostrado). Los genes *VOZ* han sido implicados muy recientemente en la vía de regulación de la floración por *phyB*, a través de la regulación indirecta del activador *FT* y del represor *FLC* (Yasui et al., 2012). Este resultado, junto con el efecto de *phyB* en los niveles de mRNA de *TEM1* y *TEM2* (Fig. 42-43 y 45) y el análisis de la interacción génica entre éstos y *phyB* (Tabla 12), nos ha permitido descubrir una función de *TEM* en la ruta de la luz mediada por *phyB*.

El estudio del efecto de la baja temperatura ambiental nos ha permitido establecer que *SVP* regula de forma directa a *TEM2* a 16°C (Fig. 65) y que ambos funcionan de forma parcialmente dependiente en la regulación de *FT* a dicha temperatura (Fig. 73, Tablas 24 y 25). Este resultado complementa el recientemente publicado efecto de regulación directa de *SVP* sobre ambos *TEM* a 22°C (Tao et al., 2012). La reducción de los niveles de *TEM* observada en condiciones de alta temperatura y fotoperiodo desfavorable podría contribuir al incremento de expresión de *FT*, que es activado por *PIF4* en estas condiciones, promoviendo la floración (Kumar et al., 2012).

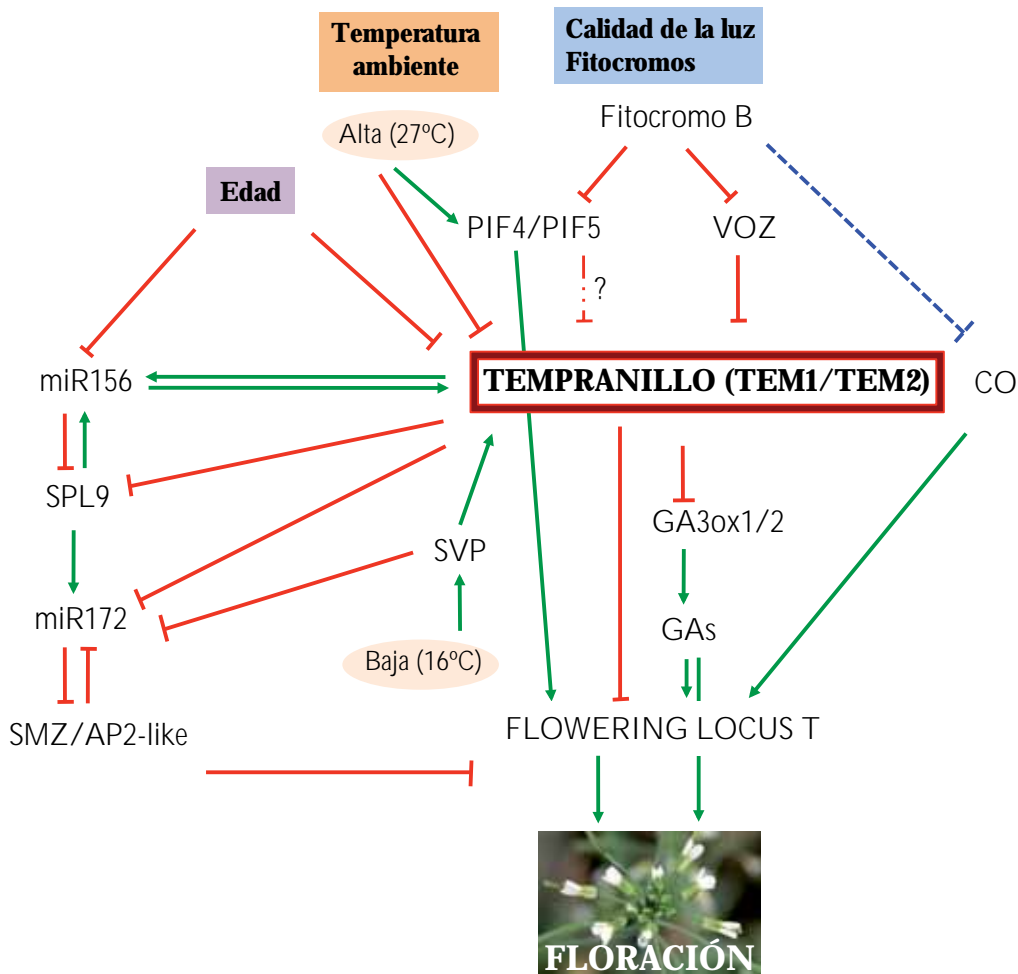
Estos resultados son un buen punto de inicio para indagar en la relación entre *VOZ* y los genes *TEM*, así como para acabar de establecer el efecto de *SVP* sobre *TEM* a bajas temperaturas.

En conjunto, las rutas genéticas implicadas en la percepción de las señales de la luz y la temperatura y en la señalización endógena, integran sus respuestas para regular de forma conjunta el inicio de la floración. Se han descrito múltiples interrelaciones entre componentes clave de las distintas rutas, como la regulación fotoperiódica de *miR172* por *GI* (Jung et al., 2007), la respuesta de *miR156* y ciertos *SPL* a la temperatura ambiental y a las giberelinas (Kim et al., 2012) o la interacción entre *SVP* y *miR172* (Cho et al., 2012), además de la conocida integración de las señales de luz y temperatura (revisado en Franklin, 2009). Según los datos que hemos obtenido en esta tesis, los genes *TEM* participan en todas estas rutas y establecen nuevas conexiones entre ellas.

Así por ejemplo, la acción represora de *SVP* sobre la expresión de *MIR172* a bajas temperaturas, y que finalmente también controla la expresión de *FT* (Cho et al., 2012), se sumaría a la regulación positiva de *SVP* sobre *TEM2* a bajas temperaturas (Fig. 66). De manera que el efecto sobre *miR172* sería doble, con *SVP* y *TEM* actuando de forma parcialmente dependiente para regular la floración a través de dos de los genes diana que

comparten, *FT* y *MIR172*, ambos promotores de la floración (sin olvidar a otros represores que también actúan en la vía de la temperatura). TEM1 y TEM2, además, lo harían a 22°C, actuando sobre los mismos genes diana.

Por tanto, consideramos que los genes *TEM* son elementos clave que refuerzan el control de la floración y la duración de las fases del desarrollo actuando en diferentes vías y sobre diferentes genes diana (Fig. 92). De esta manera, se obtiene una mayor robustez sobre el control de la floración, para asegurar que la planta no florezca antes de estar preparada para ello.



**Figura 92. Modelo que resume la principales interacciones de TEM en las diferentes rutas en las que hemos trabajado**

La edad, la baja y alta temperatura ambiental y la ruta de la calidad de la luz y el fotoperiodo, ambas mediada por los fitocromos regulan, activando o reprimiendo, la expresión de los genes TEMPRANILLO, según las condiciones ambientales y el estado endógeno, para regular la inducción floral. Las diferentes rutas comparten componentes, lo que convierte al sistema en una compleja red de interacciones moleculares.

Hablando en términos de redes génicas podríamos considerarlos nodos de conexión centrales. Las diferentes piezas que conforman el puzzle molecular se integran en una red dinámica de genes y proteínas que forman un sistema complejo. Los componentes

funcionales de estas redes son representados por nodos, entre los cuales se establecen una serie de relaciones o conexiones. Dentro de las redes moleculares, pocos nodos tienen muchas interacciones con otros, y son considerados nodos centrales. Estos nodos altamente interconectados dentro de las redes biológicas a menudo son módulos funcionales que están conservados a lo largo de la evolución (Albert, 2005; Chae et al., 2012). De esta manera, los genes *TEMPRANILLO* estarían formando un nodo altamente conectado, lo que resalta su importancia funcional y refuerza la idea de que los genes que regulan la floración, así como otros procesos del desarrollo, no actúan en rutas genéticas independientes, sino en una red compleja en la que existen múltiples interconexiones entre los distintos reguladores. De esta manera, la idea de “rutas reguladoras”, irá poco a poco quedan atrás para avanzar en el conocimiento basado en la interacción de las diferentes señales ambientales y endógenas que forman esta “red de regulación” molecular. La investigación sobre los mecanismos de acción de *TEM1* y *TEM2* en las distintas rutas de control de la floración nos permitirá en un futuro conocer más exactamente la dinámica de estas interacciones.

## **2. RAV1 no está implicado en la regulación de la floración**

En relación con la posible redundancia funcional de los genes de la familia *RAV*, las conclusiones que podemos extraer del total de experimentos realizados con los mutantes *rav1* es que no existe redundancia entre *TEM1*, *TEM2* y *RAV1* en el control del tiempo de floración. En condiciones de fotoperiodo favorable, no hemos observado cambios en el tiempo de floración entre los mutantes *rav1* y las plantas silvestres, ni a 22°C ni a 16°C (Tabla 23); así como tampoco cambios en su expresión por efecto de las temperaturas moderadamente bajas (16°C) (Fig. 58). En condiciones de fotoperiodo desfavorable a 22°C sí hemos observado una ligera reducción en el número de hojas (Tabla 5). Sin embargo, experimentos complementarios realizados posteriormente en el laboratorio indican que esta diferencia podría no ser reproducible. Por otro lado, la expresión de *RAV1* en las plantas *tem1 tem2* es más alta que en las plantas silvestres (Fig. 62), lo que sugiere que *TEM1*, *TEM2* o ambos, actuarían como represores de *RAV1*. Esto se correlacionaría con los resultados de expresión obtenidos en diferentes condiciones experimentales, plantas mutantes y sobre-expresantes, que muestran como la regulación de *TEM* y *RAV1* es inversa; como veíamos en la acción de miR156, phyB o en condiciones de sombra simulada.

En conjunto, estos datos indican que *RAV1* no actúa como represor floral de forma redundante a *TEM*, pero estaría implicado en algún proceso de manera dependiente a ellos.

### **3. Los genes de la familia *RAV* *PtRAV1/PtRAV2* de *Populus* están implicados en procesos de desarrollo y formación de yemas durmientes**

La caracterización que hemos llevado a cabo con los genes homólogos de *AtTEM/RAV* en el género *Populus*, *PtRAV1* y *PtRAV2* sugiere que están implicados en procesos de desarrollo que específicos no podemos estudiar en *Arabidopsis*, como el desarrollo de las ramas silépticas o la formación de las yemas asociadas a la parada de crecimiento y la dormancia.

Salvando las distancias al comparar el desarrollo de una planta anual con una especie perenne, parecen evidentes ciertas similitudes en los patrones de expresión de los genes *TEM/RAV* de *Arabidopsis* y sus homólogos del género *Populus*. Como se ha discutido en el capítulo 3, es difícil establecer si *PtRAV1/PtRAV2* están más próximos filogenéticamente a *AtTEM1/AtTEM2* o a *AtRAV1*, ya que comparten un alto grado de similitud con *TEM1* y *TEM2* pero también con *RAV1*.

Si se compara la expresión a lo largo de 24 horas de *PtRAV1* con la de los genes *AtTEM* y *AtRAV1*, la tendencia es más similar a la de *AtRAV1*, ya que ambos presentan un pico diurno. También la expresión de *PtRAV1* y *AtRAV1* aumenta en condiciones de frío (Fowler & Thomashow, 2002) y ambos se expresan mayoritariamente en la raíz (Kagaya et al., 1999). Todos estos datos enmarcan a los homólogos de *TEM/RAV* en un escenario en el cual no podemos descartar que *PtRAV* no actúen en la regulación de la floración, así como tampoco lo hace *AtRAV1*.

Sin embargo, tampoco podemos descartar que no estén implicados, ya que los análisis de fenotipo que hemos realizado en árboles con ambos genes *PtRAV1/2* silenciados se han llevado a cabo en etapas iniciales del crecimiento (árboles de 1 año). Además, los datos obtenidos en el análisis estacional de las plantas silvestres muestran que la expresión de *PtFT2* y *PtRAV* parece ser opuesta, lo que sugiere que podría producirse la inducción de *PtFT2* por ausencia de *PtRAV*, como sucede con *AtFT* y *AtTEM* (Castillejo & Pelaz, 2008). Otro punto de debate interesante es el papel estacional y en el desarrollo que tienen *PtFT1* y *PtFT2*, inicialmente descritos como inductores de la floración en *Populus* (Böhlenius et al., 2006; Hsu et al., 2006) y recientemente implicados en la determinación de las yemas florales y en el crecimiento activo, respectivamente (Hsu et al., 2011). Por ello no descartamos que si los genes *PtRAV* los regulan de alguna manera, esta regulación pueda observarse en otros procesos no relacionados únicamente con la floración, como por ejemplo la formación de las yemas durmientes inhibida por *PtFT1* (Böhlenius et al., 2006), proceso en que los genes *PtRAV1/2* parecen tener un papel importante en el mantenimiento de las etapas iniciales de formación de las yemas durmientes.

En relación con otros procesos del desarrollo, *AtTEM* y *PtRAV* también parecen diferir en la duración de la fase juvenil, caracterizada por la ausencia de tricomas en *Arabidopsis* y por su presencia en *Populus*, aunque de forma opuesta, ambos afectan al mismo proceso, lo que



no es extraño entre genes homólogos. En las plantas *tem1 tem2* los tricomas abaxiales aparecen antes que en las plantas silvestres, indicando que la etapa juvenil es más corta; mientras que en *Populus*, los tricomas (marca de juvenilidad) se extienden en el tiempo en los árboles *RNAi PttRAV1/2* en comparación con los silvestres.

En resumen, esta tesis aporta numerosos resultados que sugieren nuevas funciones de los genes *TEMPRANILLO*, tanto en el control de la floración como en otros procesos del desarrollo. Además, hemos mostrado cómo los genes *TEM* conectan diferentes rutas genéticas implicadas en la señalización de estímulos ambientales y endógenos, de manera que aportan robustez al complejo sistema de control de la floración en *Arabidopsis thaliana*.

## CONCLUSIONES GENERALES

---

Acorde con todos los resultados obtenidos en los distintos capítulos de esta tesis, en los que se han detallado las conclusiones específicas para cada uno de ellos, podemos extraer como conclusión general que los genes *TEM1* y *TEM2* están implicados en distintas rutas genéticas para controlar la floración en respuesta a la edad (miRNAs) y ambientales (luz y temperatura), así como en la transición de la fase juvenil a la adulta en *Arabidopsis thaliana*.

De manera general las conclusiones más relevantes son las siguientes:

1. Los genes *TEM* están implicados en el control de la transición de la fase juvenil a la adulta y en la transición a la floración regulada por la ruta de la edad (miRNA156/miR172). Esto confiere una mayor robustez al sistema de control del tiempo de floración para asegurarse que ésta no se produce demasiado pronto, cuando la planta aún es joven y tiene pocas reservas acumuladas.
2. Los genes *TEM* están afectados por la cascada de señalización de la luz, en la que actúan de forma parcialmente independiente de *phyB*. Además, los genes *VOZ* podrían relacionar directamente a los represores *TEM* con la ruta de control de la floración por *phyB*, en la que los *TEM* funcionarían como vínculo entre *VOZ* y *FT*.
3. Los genes *TEM* están afectados por las bajas y altas temperaturas de 16°C y 27°C, respectivamente. Actúan de forma parcialmente aditiva a *SVP* en la represión de la floración por una baja temperatura de 16°C; parte del efecto de *SVP* consistiría en una regulación directa de *TEM2*, y no de *TEM1*, a esta temperatura.
4. Los genes *TEM* actúan como conexión entre las rutas de la luz y la temperatura. En plantas deficientes en *phyB*, un descenso moderado de la temperatura (16°C) compensa el efecto de floración temprana con un incremento en los niveles de *TEM*, lo que finalmente conduce a unos tiempos de floración silvestres en las plantas *phyB* cultivadas a 16°C.
5. El gen *RAV1* no parece actuar de manera redundante con *TEM1* y *TEM2* para regular el tiempo de floración en condiciones de LD a 22°C o 16°C, aunque parece mostrar un ligero efecto en SD a 22°C.
6. Los genes *PtRAV1* y *PtRAV2* de *Populus* controlan la formación de las yemas en condiciones de parada estacional del crecimiento. Además, están implicados en el control de la fase juvenil y la formación de las ramas silépticas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 1.1 Material vegetal

En este trabajo se han utilizado distintas líneas silvestres, mutantes y transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que han sido generadas en nuestro laboratorio o bien, amablemente donadas por otros grupos. Así mismo, se ha trabajado con dos especies del género *Populus*, *P. tremula* y el híbrido *P. tremula x tremuloides*, a lo largo de dos estancias en el Umeå Plant Science Centre (UPSC), en Suecia (de 3 meses de duración, en dos años consecutivos); este trabajo se ha realizado en colaboración con el grupo del Dr. Ove Nilsson.

A continuación se muestra la información de todas ellas.

Línea	Ecotipo	Procedencia	Referencia
<b><i>Arabidopsis</i></b>			
WT	Col-0	-	-
WT	Ws	-	-
<i>tem1-1</i>	Col-0	Colección SALK_097513	Castillejo & Pelaz, 2008
<i>tem2-2</i>	Ws/retrocruzado con Col-0	Colección INRA FLAG_212H10	Osnato et al, 2012
<i>tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce	Osnato et al, 2012
<i>35S::TEM1</i>	Col-0	pCC33	Castillejo & Pelaz, 2008
<i>35S::TEM2</i>	Col-0	pCC79	Castillejo & Pelaz, 2008
<i>pTEM1::GUS</i>	Col-0	pCC59	Castillejo & Pelaz, 2008
<i>rav1-1</i>	Col-0	Colección SALK_021865	Woo et al, 2010
<i>tem1-1 tem2-2 rav1-1</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>phyA-211</i>	Col-0	Cedida por el Dr. J.F Martínez-García	Reed et al, 1994
<i>phyB-9</i>	Col-0	Cedida por el Dr. J.F Martínez-García	Reed et al, 1993
<i>phyC-2</i>	Col-0	Cedida por la Dr. E. Monte	Monte et al, 2003
<i>phyD-1</i>	Col-0	Cedida por el Dr. J.F Martínez-García	Sharrock et al, 1997
<i>phyB-9 tem1-1</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>phyB-9 tem2-2</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>phyB-9 tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>phyB-9 35S::TEM1</i>	Col-0	Cruce (F2)	Este trabajo
<i>phyB-9 pTEM1::GUS</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>hy5-ks50</i>	Ws	Cedida por el Dr. Deng	Oyama et al, 1997
<i>hy5-ks50 tem2-2</i>	Ws	Cruce (F2)	Este trabajo
<i>pif4-101</i>	Col-0	Cedida por el Dr. O. Nilsson	Lorrain et al, 2008
<i>pif5-1 (pif6-1)</i>	Col-0	Cedida por el Dr. O. Nilsson	Fujimori et al, 2004
<i>pif4-101 pif5-1</i>	Col-0	Cedida por el Dr. O. Nilsson	Lorrain et al, 2008
<i>35S::PIF4</i>	Col-0	Cedida por el Dr. O. Nilsson	Lorrain et al, 2008
<i>35S::PIF5</i>	Col-0	Cedida por el Dr. O. Nilsson	Lorrain et al, 2008
<i>svp-41</i>	Col-0	Cedida por el Dr. M. Kater	Hartmann et al., 2000
<i>svp-41 tem1-1</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>svp-41 tem2-2</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>svp-41 tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo

<i>voz1-1</i>	Col-0	Cedida por el Dr. F. Madueño	Publicado como <i>voz1-2</i> por Yasui et al., 2012
<i>voz2-1</i>	Col-0	Cedida por el Dr. F. Madueño	No publicado
<i>voz2-2</i>	Col-0	Cedida por el Dr. F. Madueño	Publicado como <i>voz2-1</i> por Yasui et al., 2012
<i>voz1-1 voz2-1</i>	Col-0	Cedida por el Dr. F. Madueño	No publicado
<i>35S::VOZ1</i>	Col-0	Cedida por el Dr. F. Madueño	No publicado
<i>35S::MIR156</i>	Col-0	Cedida por el Dr. D. Weigel	Schwab et al., 2005
<i>35S::MIM156</i>	Col-0	NASC ID: N9953	Franco-Zorrilla et al., 2007
<i>pSPL9::rSPL9</i>	Col-0	Cedida por el Dr. S. Poethig	Wang et al, 2008
<i>spl9-2 spl15-2</i>	Col-0	Cedida por el Dr. P. Huijser	Schwarz et al, 2008
<i>35S::rSPL3</i>	Col-0	Cedida por el Dr. S. Poethig	Wu and Poethig, 2006
<i>35S::MIM172</i>	Col-0	Cedida por el Dr. D. Weigel	Todesco et al, 2010
<i>35S::MIR156 pTEM1::GUS</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>35S::MIR156 tem1-1</i>	Col-0	Cruce	Este trabajo
<i>35S::MIR156 tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>35S::MIM156 tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce (F2)	Este trabajo
<i>pSPL9::rSPL9 tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>spl9-2 spl15-2 tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>35S::MIM172 tem1-1 tem2-2</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>35S::MIR156 35S::TEM1</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>35S::MIM156 35S::TEM1</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>pSPL9::rSPL9 35S::TEM1</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>spl9-1spl15-1 35S::TEM1</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo
<i>35S::MIM172 35S::TEM1</i>	Col-0	Cruce (F1)	Este trabajo

Línea	Ecotipo	Procedencia	Referencia
<i>Populus</i>			
WT	<i>P. tremula x tremuloides</i> (Clon T89)	-	-
WT	<i>P. tremula</i>	-	-
<i>PttRAV1/2 RNAi</i>	Clon T89	pEM2	Este trabajo

**Tabla 27. Información de genotipos, ecotipos, procedencia y referencia de las semillas utilizadas.**

F1 y F2 indican la fase en la que se encuentran los cruces que no están aún en homocigosis.

### 1.1.1 Condiciones de cultivo para *Arabidopsis thaliana*

A lo largo de este trabajo se han cultivado plantas de *Arabidopsis* tanto en macetas como en placas estériles, dependiendo del experimento. En ambas situaciones, las plantas crecieron en cámaras donde se mantuvieron controladas las condiciones de fotoperiodo y temperatura. Por lo general, las semillas fueron estratificadas en oscuridad, a 4°C durante 2-4 días para su sincronización, con independencia del medio en el que fueran sembradas. Se ha trabajado tanto en condiciones de fotoperiodo inductivo de día largo (DL) de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, como en condiciones de fotoperiodo no inductivo de día corto (DC) de 8 h de luz y 16 h de oscuridad. Las condiciones de temperatura se adaptaron a las necesidades experimentales, siendo de 16°C, 22°C o 27°C.

### **i. Cultivo en tierra**

Para realizar los experimentos de control del tiempo de floración y ciertos experimentos de análisis de expresión génica, se sembraron semillas de *Arabidopsis* en macetas que contenían una mezcla de turba:perlita:vermiculita en proporción 4:1:1. Para el tiempo de floración, se usaron macetas de 5 cm de diámetro con una única planta; para los de expresión se usaron macetas mayores, de 9 cm de diámetro, donde se sembraron las semillas de manera que las plantas no se hicieran sombra al crecer. Cada maceta se correspondía con un día o tiempo de recogida. Al realizar los experimentos de floración y de expresión en las mismas cámaras se han podido correlacionar ambos resultados. Las plantas se cultivaron en cámara visitables o fitotrones horizontales, bajo condiciones de luz procedente de dos tipos de tubos fluorescentes: unos de luz fría blanca (TL5 54W, tono 965), suplementados con luz cálida (TL5 54W, tono 840), que proporcionaban 80-90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , según las cámaras utilizadas.

### **ii. Cultivo en condiciones estériles *in vitro***

Ciertos análisis de expresión se llevaron a cabo en condiciones *in vitro*; para ello, se usaron placas de Petri de 9 cm de diámetro, que contenían medio MS-agar suplementado con 1% de sacarosa (ver sección 1.4). En cada placa se sembró un número determinado de semillas de manera que las plantas no se hicieran sombra al crecer. Cada placa se correspondía con un día o tiempo de recogida. La iluminación procedía de tubos fluorescentes de luz blanca que proporcionaban 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . En todos los casos, las semillas se esterilizaron durante 4-6 horas mediante el método de fase-vapor de cloro, con el que se produce una esterilización superficial por liberación de vapores de una solución de hipoclorito sódico (lejía 5%) y ácido clorhídrico al 37%.

#### **1.1.2 Condiciones de cultivo para *Populus***

Las plantas del género *Populus* con las que se ha trabajado crecieron en condiciones experimentales diversas: (a) árboles en condiciones de invernadero, (b) árboles en cámaras visitables, (c) plántulas en condiciones *in vitro* y (c) árboles en condiciones naturales (experimentalmente no controladas). En general, en las situaciones (a), (b) y (c) se mantenían controlados los parámetros de temperatura, humedad y fotoperiodo. Se detallan a continuación las condiciones específicas de cada situación experimental.

- (a) Invernadero: árboles plantados en tierra; luz natural suplementada con luz artificial (densidad de flujo de fotones de 150  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ) para asegurar un fotoperiodo de DL de 18 h de luz; rango de temperatura variable entre 18-25°C; humedad alrededor de un 55%.
- (b) Cámaras visitables: árboles plantados en tierra; luz procedente de tubos fluorescentes, con fotoperiodo y temperatura determinados según requisitos experimentales. Condiciones de DL: 18 h de luz, temperatura 18°C, humedad alrededor del 80%.

Condiciones de DC: 14 h de luz, temperatura diurna 20°C/nocturna 15°C, con humedad alrededor del 80%. Condiciones de DC y frío: 14 h de luz, temperatura 6°C, humedad alrededor del 80%.

- (c) *In vitro*: los tallos y posteriormente las plántulas de *P. tremula x tremuloides*, transformados mediante infección por *A. tumefaciens*, se desarrollaron en condiciones *in vitro* controladas (en medios de cultivo suplementados con hormonas para promover el completo desarrollo de las plántulas; ver sección 1.4), en cámaras de cultivo visitables en condiciones controladas de luz y temperatura: fotoperiodo de 16 h, temperatura de 25°C, intensidad lumínica de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aportada por tubos fluorescentes de luz blanca.
- (d) Condiciones naturales: para un experimento determinado se usaron muestras procedentes de un árbol que ha crecido (y sigue creciendo) en condiciones experimentales no controladas, en el exterior del UPSC, en Umeå (Suecia). Umeå se sitúa a 63°N; la media de horas de luz en otoño/invierno es de 8h con una temperatura media de -10°C, mientras que la media de horas de luz en primavera/verano es de 16h y una temperatura media que ronda los 9°C. Datos tomados de las bases de datos meteorológicas (promedio de 30 años de datos): [www.freemeteo.com](http://www.freemeteo.com) y <http://www.dinstartsida.se/solen-ort.asp?id=1854>

#### **i. Cultivo en tierra (invernadero y cámaras visitables)**

Como se ha descrito previamente, las condiciones de crecimiento en tierra, ya fueran en invernadero, en cámaras visitables o bajo condiciones naturales, son muy variadas. En estas condiciones se han llevado a cabo la mayoría de los experimentos de expresión, la caracterización fenotípica de las líneas de *RNAi RAV1/2* y los experimentos de producción de yemas durmientes en condiciones de DC y frío.

#### **ii. Cultivo en condiciones estériles *in vitro***

En condiciones *in vitro* se llevaron a cabo dos experimentos; el primero fue la generación y propagación de las líneas transgénicas *RNAiRAV1/2*, en condiciones estériles, a partir de la transformación de tallos mediante *A. tumefaciens* (ver sección 2.6). Una vez desarrolladas completamente, las líneas de interés pasaron a tierra, en condiciones de invernadero, donde completaron su desarrollo. El segundo experimento fue un análisis de expresión realizado en esas líneas para determinar la reducción de la expresión de los genes *RAV1* y *RAV2* por la construcción de silenciamiento por RNAi.

### **1.1.3 Selección de semillas y plantas transgénicas (*Arabidopsis*)**

Para la selección de semillas transgénicas portadoras de resistencia a antibióticos o herbicidas, se usaron placas selectivas con una base de MS-agar al 1% de sacarosa y el agente selectivo correspondiente. Para la selección de semillas o plantas transgénicas portadoras de

genes reporteros, se realizó (a) una selección mediante lupa (*Olympus DP71*) equipada con filtro de GFP, para semillas que expresan la proteína fluorescente verde (GFP); o (b) un ensayo histológico para la detección de la  $\beta$ -glucoronidasa (GUS) para plantas que expresan el gen reportero GUS.

## 1.2 Microorganismos

### 1.2.1 Cepas bacterianas y levaduras

A lo largo de esta tesis se han utilizado las siguientes bacterias y levaduras:

#### Bacterias:

- *One shot TOP10 competent cells* (Invitrogen): Esta cepa de *E. coli* se ha utilizado para la propagación de DNA plasmídico.
- *DB3.1 competent cells* (Invitrogen): Esta cepa de *E. coli* se ha utilizado para la propagación de plásmidos que contienen el gen letal *ccaB*, diseñado para el uso de vectores Gateway®.
- *GV3101 (pMP90RK)*: Esta cepa de *A. tumefaciens* se ha utilizado para transformar callos de *P. tremula x tremuloides* (T89).

#### Levaduras:

- AH109: Esta cepa de *Saccharomyces cerevisiae* se ha utilizado como cepa portadora de la genoteca de cDNAs utilizada en el experimento de híbrido sencillo.
- Y187: Esta cepa de *S. cerevisiae* se ha utilizado como cepa portadora del fragmento del promotor con el que se llevó a cabo el experimento de híbrido sencillo.

## 1.3 Plásmidos

### 1.3.1 Vectores utilizados

#### 1.3.1.1 Vectores de clonación para productos de PCR

- pCRII-TOPO (Invitrogen): Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR, selección por Kanamicina (Kan<sup>R</sup>) o Ampicilina (Amp<sup>R</sup>)
- pGEM-T Easy (Promega): Vector utilizado para el clonaje de productos de PCR (Amp<sup>R</sup>)

#### 1.3.1.2 Vectores para clonación mediante tecnología GATEWAY®

- pENTR3C (Invitrogen): Vector de entrada. Kan<sup>R</sup> en bacterias.
- pHELLSGATE12: Vector binario de destino para el silenciamiento de genes de interés. Esta construcción permite clonar dos copias en orientaciones opuestas de la secuencia parcial del gen o genes de interés, separadas por un intrón, para generar un RNA interferente. Selección por Spectomicina (Spec<sup>R</sup>) en bacterias y Kanamicina (Kan<sup>R</sup>) en plantas (Helliwell & Waterhouse, 2005).

#### 1.3.1.3 Vectores para ensayos de levadura

- pHISi-1 (Clontech): Vector cebo empleado para el ensayo de híbrido sencillo, en el que se clona el fragmento del promotor objeto de estudio.
- pGADT7rec (Clontech): vector presa empleado para el ensayo de híbrido sencillo, que contiene la genoteca de cDNAs.

### 1.3.2 Construcciones

A continuación se enumeran las construcciones realizadas a lo largo de esta tesis.

Construcción	Vector	Descripción y Uso
<b>Arabidopsis</b>		
<b>Ensayo de híbrido sencillo</b>		
pEM3	pCRII-TOPO	Fragmento de 711 nt del promotor de <i>TEM1</i> (-1 / -711 ATG), amplificado usando los oligos "Fragment1 pTEM1 FOR" y "Fragment1 pTEM1 REV" y clonado en el vector pCRII-TOPO.
pEM4	pCRII-TOPO	Fragmento de 710 nt del promotor de <i>TEM1</i> (-689 / -1399 ATG), amplificado usando los oligos "Fragment2 pTEM1 FOR" y "Fragment2 pTEM1 REV" y clonado en el vector pCRII-TOPO.
pEM5	pCRII-TOPO	Fragmento de 689 nt del promotor de <i>TEM2</i> (-675 / -1391 ATG), amplificado usando los oligos "Fragment1 pTEM2 FOR" y "Fragment1 pTEM2 REV2" y clonado en el vector pCRII-TOPO.
pEM6	pCRII-TOPO	Fragmento de 716 nt del promotor de <i>TEM2</i> (-675 / -1391 ATG), amplificado usando los oligos "Fragment2 pTEM2 FOR" y "Fragment2 pTEM2 REV" y clonado en el vector pCRII-TOPO.
pEM9	pHISi-1	Fragmento de pEM3 subclonado en pHISi-1 para ensayo de híbrido sencillo.
pEM10	pHISi-1	Fragmento de pEM4 subclonado en pHISi-1 para ensayo de híbrido sencillo.
pEM11	pHISi-1	Fragmento de pEM6 subclonado en pHISi-1 para ensayo de híbrido sencillo.
<b>Populus</b>		
<b>RNAi PttRAV1/RAV2</b>		
pEM1	pENTRY (pENTR3C)	Fragmento de 285 nt amplificado de la secuencia codificante e <i>RAV1/RAV2</i> usando los oligos RAV RNAi FOR1-BamHI y RAV RNAi REV-XhoI y clonado en el vector pENTR3C.
pEM2	pDESTINY (pHELLSGATE12)	Fragmento de 285 nt procedente de pEM1 recombinado mediante clonasa LR en el vector final pHELLSGATE12.

#### Tabla 28. Construcciones realizadas.

Se detallan las construcciones para los ensayos de Y1H partiendo de fragmentos de promotores de *Arabidopsis* y la construcción para el silenciamiento de genes endógenos de *Populus* a partir de cDNA de *Populus tremula x tremuloides*.

### 1.4 Medios de cultivo

#### 1.4.1 Medios de cultivo de plantas *in vitro*

**Medio MS1:** utilizado para el cultivo de *A. thaliana* en condiciones *in vitro*. Compuesto por 4,4 g/L de medio *Murashige&Skoog* con vitaminas, 0,5 g/L de tampón MES, 10 g/L de sacarosa y 8 g/L de bactoagar. pH ajustado a 5,8 Esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 min.

#### 1.4.2 Medios de cultivo de bacterias y levaduras



Medio LB (Luria-Bertani): utilizado para el cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Compuesto por 10 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl; pH ajustado a 7,5. Para medio sólido se añaden 15 g/L de bactoagar. Esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 min.

Medio YPD/YPD(A): utilizado para el cultivo de *S. cerevisiae* (levadura) sin auxotrofias. Compuesto por 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 2% de un stock de glucosa al 40% (esterilizada en autoclave); pH ajustado a 5,8. Para medio sólido se añaden 15 g/L de bactoagar. Esterilizado en autoclave antes de añadir la glucosa, a 120°C durante 20 min. Se puede suplementar el medio con 50 mg de adenina hemi-sulfato.

Medio SD: utilizado para cultivo de *S. cerevisiae* (levadura) en condiciones de medio mínimo; para cepas auxótrofas que han sido transformadas. Compuesto por 6,7 g/L base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni sulfato amónico, 2% de un stock de glucosa al 40% (esterilizada en autoclave); pH ajustado a 5,8. Esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 min.

Solución Dropout 10x (DO): utilizada para complementar al medio mínimo SD con aminoácidos. Se prepara una solución base 10X de los siguientes aminoácidos, excluyendo aquellos que permiten hacer la selección de las levaduras transformadas.

	<u>Concentración 10X</u>
L-Isoleucina	300 mg/l
L-Valina	1500 mg/l
L-Adenina	200 mg/l
L-Arginina HCl	200 mg/l
L-Histidina	200 mg/l
L-Leucina	1000 mg/l
L-Lisina (HCl)	300 mg/l
L-Metionina	200 mg/l
L-Fenilalanina	500 mg/l
L-Treonina	2000 mg/l
L-Triptófano	200 mg/l
L-Tirosina	300 mg/l
L-Uracilo	200 mg/l

**Tabla 29. Descripción de las concentraciones de los aminoácidos utilizados.**

Solución 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol): utilizado como inhibidor de la síntesis de histidina en placas SD-His. Se prepara una solución stock 1M (84,08 g/L), se filtra y se conserva a 4°C. La solución filtrada se añade a placas SD-His en diferentes concentraciones (50 mM, 40 mM, 30 mM, 15 mM y 0 mM) para determinar la concentración mínima que permite reducir el crecimiento de fondo de levaduras que tienen una expresión basal de histidina.

### 1.4.3 Antibióticos y reactivos

<b>Antibióticos/reactivos</b>	<b>Concentración de trabajo (µg/ml)</b>		
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Planta
Kanamicina (Kan)	25/50	25/50	25/50
Fosfotricina (PPT o BASTA)	-	-	15/20
Gentamicina (Gen)	-	50	-
Espectinomicina (Spec)	100	100	-
Isopropil-b-D-tio-galactósido (IPTG)	23,8	-	-
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopiranosido (X-Gal)	40	-	-

**Tabla 30. Descripción de las concentraciones de trabajo de los antibióticos y reactivos utilizados.**

## **2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **2.1 Extracción de ácidos nucleicos**

#### **2.1.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli***

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se partió de 5 ml de cultivo de *E. coli* en medio LB, suplementado con el correspondiente antibiótico, e incubados durante una noche a 37°C y con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se aisló el DNA usando *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para aislar DNA plasmídico a escala mediana, se partió de 25 ml de cultivo en medio LB, suplementado con el correspondiente antibiótico, e incubados durante una noche a 37°C y con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se procedió a aislar el DNA con *Qiagen Plasmid Midi Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En ambos casos, se determinó la cantidad y calidad del DNA obtenido (medida cuantitativa), mediante medida de su absorbancia a 260 y 280 nm, en espectrofotómetro *ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

#### **2.1.2 Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis***

El DNA genómico usado como molde tanto para reacciones de PCR como para clonaciones, se extrajo siguiendo el protocolo de Edwards et al, 1991, con un paso adicional de extracción con cloroformo. Se recogieron 1-3 hojas jóvenes de roseta o caulinares, las cuales se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su extracción. La homogeneización del tejido congelado se realizó mediante un homogeneizador mecánico (30.000 rpm 30 s<sup>-1</sup> min), con la ayuda de perlas de borosilicato de 4 mm de diámetro (Sigma-Aldrich).

Para los genotipados, se siguió el protocolo mencionado, usando como molde para cada reacción de PCR 2,5 µl de DNA genómico eluido en H<sub>2</sub>O. Para las clonaciones, se siguió el mismo protocolo mencionado pero se añadió un paso adicional de extracción con cloroformo. Para comprobar la integridad del DNA (medida cualitativa), se cargaron 5 µl del DNA obtenido, junto con un tampón de carga y agua, en geles de agarosa/TAE para su posterior electroforesis.

#### **2.1.3 Extracción de DNA plasmídico de levadura *S. cerevisiae***

El DNA plasmídico usado como molde para las reacciones de PCR realizadas en el experimento de híbrido sencillo se extrajo siguiendo el protocolo que se describe a continuación (partiendo de células cultivadas en medio líquido a 37°C a lo largo de toda la noche):

1. Centrifugación de 1 ml de cultivo en tubo de microcentrifuga, a 10.000 rpm durante 5 min. Eliminación de la fase acuosa superior.

2. Congelación a -20°C del sedimento durante 5-10 min para facilitar la rotura celular.
3. Adición 200 µl tampón de lisis y 200 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
4. Agitación por vórtex 2 min y centrifugación a 10.000 rpm durante 5 min.
5. Recuperación de 200 µl de la fase superior acuosa en un nuevo tubo.
6. Adición de 1/10 (v/v) de acetato de sodio (AcNa 3 M) y 2,5 V de etanol absoluto.
7. Centrifugación a 13.000 rpm 10 minutos. Eliminación de la fase acuosa superior.
8. Lavado del sedimento con etanol 70%, centrifugación y descarte de la fase acuosa .
9. Secado del sedimento al aire durante 5 min.
10. Resuspensión en 20 µl de agua.

Se usaron 1,5 µl por reacción de PCR.

El tampón de lisis utilizado contenía 2% de tritón x-100, 1% de SDS, 100 mM NaCl, 10 mM de Tris pH8 y 1 mM de EDTA.

## **2.1.4 Extracción de RNA total y tratamiento con DNasa**

### *i. Arabidopsis*

Para realizar los experimentos de análisis de expresión génica, se llevaron a cabo extracciones de RNA total. Cuando fue necesario recoger el material en condiciones de oscuridad, se usó una linterna con una luz (LED) verde de baja irradiancia. Estas condiciones de luz se consideran seguras para el trabajo con fitocromos, ya que inducen sólo las mínimas respuestas por exposición de luz en condiciones de oscuridad (Fankhauser & Casal, 2004). En general, se recogieron conjuntos de plántulas, se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvieron a -80°C hasta la extracción del RNA. La homogenización del tejido congelado se realizó mediante molido en mortero de porcelana enfriado con N<sub>2</sub> líquido. La posterior extracción del RNA total se realizó mediante la utilización del sistema *PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification Kit* (Invitrogen-Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el RNA total, se determinó su calidad, pureza y concentración por dos métodos (a) mediante electroforesis en gel de agarosa/TAE (para verificar su integridad), (b) mediante medida cuantitativa de su absorbancia a 260 y 280 nm, en espectrofotómetro *ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Una vez cuantificado, se trataron 5-10 µg de RNA total con DNasa utilizando el sistema *Ambion's DNA free-kit* (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se volvió a cuantificar después del tratamiento de DNasa para determinar el volumen necesario para realizar la reacción de retrotranscripción.

### *ii. Populus*

Para realizar los experimentos de análisis de expresión génica, se llevaron a cabo extracciones de RNA total de diferentes muestras de tejido de hoja, floema, xilema, raíz, pecíolo, vena principal y lámina de hoja; las condiciones específicas se detallan en el manuscrito del capítulo X. En general, una vez recogido el material, se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvo

congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La homogenización del tejido congelado se realizó mediante molido en mortero de porcelana enfriado con  $\text{N}_2$  líquido. La extracción del RNA total se realizó mediante la utilización de dos sistemas: (1) Aurum<sup>TM</sup> Total RNA Mini Kit (Bio-Rad) y (2) TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen), en ambos casos siguiendo las instrucciones del fabricante. El posterior procesamiento del RNA se realizó tal y como se detalla en el apartado anterior, con la única diferencia que se trataron 1-2  $\mu\text{gr}$  de RNA total con DNasa.

### **2.1.5 Extracción de RNA total enriquecido en miRNAs**

Para el aislamiento del RNA total, incluyendo RNA pequeños (miRNAs), se procedió a realizar una extracción con TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen), con una extracción de cloroformo, según las instrucciones del fabricante. El posterior procesamiento del RNA se realizó tal y como se detalla en el apartado 2.1.4. El RNA tratado con DNasa se trató como sigue:

1. Precipitación con 1/10 V de acetato sódico 3M, pH 5,5 y 2,5 V de 100% etanol, durante al menos 30 min a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
2. Centrifugación a 12000 g durante al menos 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$
3. Lavado con etanol al 75%
4. Centrifugación a 7500 g durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$
5. Secado del sedimento al aire
6. Resuspensión en  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas

Paso opcional: incubación durante 10 min a  $65^{\circ}\text{C}$  para ayudar a resuspender el RNA

### **2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para amplificar fragmentos de DNA se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988). Como material de partida se ha usado: (a) DNA genómico, (b) DNA plasmídico, (c) colonias de *Agrobacterium* y (d) cDNA complementario a RNA.

Las reacciones en las que se ha utilizado material procedente de *Arabidopsis*, se han llevado a cabo en un volumen final de 25-50  $\mu\text{l}$ , utilizando normalmente 2,5  $\mu\text{l}$  de DNA molde, en una reacción compuesta por los siguientes reactivos: 1x tampón de PCR con  $\text{MgCl}_2$  (Promega), 0,5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs y 2,5U Taq polimerasa. En el caso de productos de PCR para su posterior clonación, se utilizó una mezcla de Taq polimerasa (GoTaq, Promega) y 1/10 de *Pfu DNA polymerase*, de este modo se añadió actividad correctora 3'  $\rightarrow$  5' exonucleasa de la *Pfu* con la alta capacidad de amplificación de la GoTaq de Promega.

Las reacciones en las que se ha utilizado material procedente de *Agrobacterium*, para la comprobación del clon portador del vector de interés, se han llevado a cabo en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , utilizando una pequeña cantidad de material procedente de colonias como DNA molde, en una reacción compuesta por los siguientes reactivos: 1x tampón de PCR que ya contenía los dNTPs, el  $\text{MgCl}_2$  y la GoTaq polimerasa (Promega), además de 0,2  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido.

Las reacciones en las que se ha utilizado material procedente de levadura, después de su recuperación mediante extracción del DNA (ver apartado 2.1.3), se han llevado a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l, utilizando 1,5  $\mu$ l de DNA molde, en una reacción compuesta por los siguientes reactivos: 1x tampón de PCR sin coloración, 200  $\mu$ M dNTPs, y GoTaq polimerasa (Promega), además de 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleótido.

Los oligonucleótidos utilizados están descritos en la tabla 7. Las reacciones se realizaron siguiendo las siguientes condiciones estándar de amplificación, modificándolas en caso necesario para optimizar la reacción:

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1. Desnaturalización inicial	94°C	2 min.
2. Desnaturalización	94°C	30/45 s
3. Hibridación	55-60°C <sup>3</sup>	30/45 s
4. Extensión	72°C	X s <sup>4</sup>
5. Repetición X ciclos a partir del paso 2 <sup>5</sup>		
6. Extensión final	72°C	5 min.

**Tabla 31. Condiciones estándar para amplificación de fragmentos de DNA por PCR.**

### 2.2.1 Purificación de productos de PCR

Algunos productos de PCR fueron purificados después de la separación de sus fragmentos en gel de agarosa/TAE mediante electroforesis. Esta técnica permite el aislamiento de un único fragmento para su posterior tratamiento, normalmente para su clonación o secuenciación. Una vez identificados los fragmentos de interés, se cortaron del gel y se aislaron mediante dos técnicas: de forma rutinaria, se usó el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el aislamiento de los fragmentos de DNA de levadura amplificados mediante PCR (llevado a cabo en el experimento de híbrido sencillo), se siguió el siguiente protocolo (partiendo del producto de PCR):

1. Precipitación del producto de PCR mediante adición de 1 volumen de isopropanol.
2. Centrifugación a máxima velocidad durante 30 minutos. Eliminación de la fase acuosa superior.
3. Lavado del sedimento con etanol 70% y centrifugación a máxima velocidad durante 20 minutos.
4. Eliminación de la fase acuosa superior y secado del sedimento al aire durante 10 minutos.
5. Resuspensión con 9  $\mu$ l de agua.
6. Comprobación en gel, cargando 1  $\mu$ l en gel de agarosa/TAE.

El DNA obtenido mediante el kit se cuantificó de la manera descrita en el apartado 2.1.1; el DNA obtenido mediante precipitación con isopropanol, se comprobó por visualización en gel de agarosa/TAE.

<sup>3</sup> Esta temperatura depende de las características de cada par de oligonucleótidos.

<sup>4</sup> El tiempo es variable dependiendo de la longitud del fragmento a amplificar (a razón de 1kb/min.).

<sup>5</sup> Normalmente, entre 28-35 ciclos.

### **2.3 Clonación de productos obtenidos por PCR**

Para el clonaje de productos de PCR se han utilizado tres plásmidos comerciales, *pCRII-TOPO*<sup>®</sup> de *TA cloning* (Invitrogen), *pGEM*<sup>®</sup> *T-Easy* (Promega) y *pENTR3C*<sup>®</sup> (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de amplificación mediante PCR, se diseñaron oligonucleótidos con colas que contenían dianas de restricción específicas para facilitar la digestión y clonación en los vectores. A partir de estos vectores se realizó la secuenciación del DNA para comprobar la correcta amplificación de los fragmentos. La secuenciación se ha realizado en el Servicio de Secuenciación del CRAG (según el método Sanger), utilizando oligonucleótidos específicos. La longitud media de lectura mediante este método es de 600-700 pb. Las secuencias fueron comprobadas mediante alineamiento local básico (BLAST).

#### **2.3.1 Digestión de DNA**

Para las digestiones de fragmentos de DNA, bien sean productos de PCR o DNA plasmídico, se han usado enzimas de las casas comerciales Roche y/o Fermentas. Cada una de ellas, siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **2.3.2 Ligación de fragmentos de DNA**

Las ligaciones de fragmentos de DNA se realizaron manteniendo una relación molar 1:3 entre vector e inserto, previamente purificados y cuantificados mediante espectrofotómetro (Nanodrop). Las reacciones se prepararon en hielo y contenían 1x volumen del tampón de ligación, 1U de ligasa de DNA T4 (Roche), y las cantidades apropiadas de vector e inserto. Las reacciones se incubaron durante toda una noche (12-16 horas) en baño a 16°C.

### **2.4 Reacción de recombinación mediante extremos LR (tecnología Gateway)**

El uso del sistema Gateway<sup>®</sup> facilita la integración de secuencias en vectores de destino mediante su recombinación con vectores de entrada específicos. Los vectores de entrada tienen extremos attL y los vectores de destino, attR; mediante la enzima clonasa LR (Invitrogen) estos extremos pueden recombinar y facilitan el intercambio de la región clonada de interés entre el vector de entrada y el vector de destino. La selección de las colonias recombinantes es relativamente sencilla ya que serán las únicas que puedan crecer en un medio con selección específica para el vector de destino. La reacción se realizó en hielo, procurando que la enzima se descongelase en hielo y manteniéndola el mínimo tiempo posible fuera del congelador, y se procedió siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.5 Transformación bacteriana**

La preparación de las células bacterianas se ha realizado por dos métodos diferentes: choque térmico o electroporación.

### 2.5.1 Transformación de *E. coli* por choque térmico

En el caso de bacterias *E. coli*, trabajamos con una cepa que es competente para transformación mediante choque térmico. Para dicha transformación se ha seguido el protocolo que se describe a continuación:

1. Descongelación en hielo de una alícuota de células *TOP10* (Invitrogen) competentes mantenidas a una temperatura de congelación de  $-80^{\circ}\text{C}$
2. Adición de DNA plasmídico (50-100 ng)
3. Incubación en hielo 20-30 minutos
4. Aplicación de un choque térmico durante 45 s-1 min a  $42^{\circ}\text{C}$
5. En condiciones estériles, adición de 250  $\mu\text{l}$  de medio LB atemperado sin antibióticos
6. Incubación 1h a temperatura constante de  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación (200 rpm) para recuperar las células después del choque térmico.

Una vez transformadas y recuperadas después de la transformación, las células se siembran en placas de LB-agar que contienen el antibiótico/s adecuado/s. Normalmente se siembran dos volúmenes diferentes para asegurar el crecimiento de colonias aisladas y se cultivan a lo largo de toda una noche (12-16 h) en estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.2 Transformación de *A. tumefaciens* por electroporación

*Agrobacterium tumefaciens* se ha transformado mediante electroporación, más eficiente para este tipo de células. Ya que esta transformación estaba destinada a la posterior transformación de callos de *Populus tremula x tremuloides*, este paso del protocolo se realizó en el UPSC, de Umeå (Suecia).

Se transformaron con la construcción pEM2 que contiene el plásmido binario pHELLSGATE12 y un fragmento de 285 nt de *PttRAV1/RAV2* siguiendo el siguiente protocolo:

1. Descongelación en hielo de una alícuota de células *GV3101* (*pMP90RK*) mantenidas a una temperatura de congelación de  $-80^{\circ}\text{C}$ .
2. Adición de 1,5  $\mu\text{l}$  de DNA plasmídico (50-100 ng), mantener en hielo.
3. Enfriamiento de la cubeta de electroporación en hielo.
4. Traspaso de las células a la cubeta, manteniéndolas en hielo mientras se prepara el electroporador, en este caso, un *Pulser Controller* (Bio-Rad Laboratories).
5. Aplicación del pulso eléctrico: 400  $\Omega$ , 2 kV y 25  $\mu\text{F}$
6. Adición de 500  $\mu\text{l}$  de medio LB sin antibióticos y traspaso inmediato de las células a un nuevo tubo.
7. Incubación 2h a temperatura constante de  $28^{\circ}\text{C}$  con agitación a 200 rpm.

Una vez transformadas y recuperadas, se siembran en placas de LB con los antibióticos selectivos adecuados y descritos en la tabla del apartado 1.5 (Tabla 3). La incubación en estufa de  $28^{\circ}\text{C}$  se alarga hasta los 2 días.

La comprobación de las colonias se realizó por PCR de colonias, usando los oligonucleótidos Sela4831 y Sela4415, descritos en la tabla 7.

## **2.6 Transformación de tallos de *Populus tremula x tremuloides* por *Agrobacterium***

El protocolo de transformación de *P. tremula x tremuloides* fue descrito por primera vez por el Dr. Ove Nilsson y colaboradores (Nilsson et al., 1992). Dicha transformación se realiza sumergiendo segmentos de tallo con extremos cortados en una solución que contiene células de *Agrobacterium* transformadas con el vector de interés, para facilitar su infección. Una vez infectados, los segmentos de tallo se cultivan en condiciones estériles en placas que contienen medios suplementados con hormonas, para estimular la formación de los tallos, además de antibióticos para seleccionar los tallos transformados con la construcción de interés. El cultivo posterior se realiza según las condiciones de cultivo *in vitro* y cultivo en invernadero descritas en el apartado 1.1.2. Se muestra el proceso completo desde la transformación y selección de los callos en condiciones de cultivo *in vitro* (Fig. 1, 1-3) hasta la obtención de las líneas transgénicas de interés cultivadas en condiciones de invernadero, un año más tarde (Fig.1, 4-7).

El protocolo de transformación y selección de las líneas transgénicas de interés lo realizan los técnicos del Servicio de transformación y cultivo *in vitro* del UPSC, por lo que únicamente voy a detallar aquí la preparación de los cultivos celulares de *A. tumefaciens* que se les facilitan para su posterior uso en la transformación.

Partiendo de los cultivos de *Agrobacterium* incubados en placa durante dos días, se prosigue con el siguiente protocolo:

1. Preparación de pre-cultivos: inoculación de colonias aisladas en 5 ml de medio líquido LB suplementado con antibióticos específicos.
2. Cultivo de las células durante 24 h a 28°C
3. Preparación de cultivos: inoculación de 1 ml del pre-cultivo en 50 ml de medio líquido LB suplementado con antibióticos específicos.
4. Cultivo de las células durante 24h a 28°C, hasta alcanzar DO<sub>600</sub> de 0,5-0,8.
5. Centrifugación a 3000 rpm durante 10-15 min

El sedimento obtenido se llevó al Servicio de transformación para su posterior procesado en infección de tallos de *P. tremula x tremuloides*.





**Figura 93. Proceso de transformación y cultivo para obtención de líneas transgénicas en *Populus tremula x tremuloides***

### 2.7 Obtención de células competentes de levadura y transformación

Para obtener células competentes de *S.cerevisiae* se partió de un cultivo de 15 ml de células de levadura de la cepa Y187, incubado durante 12-16h a 28/30°C en agitación constante a 250 rpm. Y se siguieron los pasos descritos a continuación:

Células competentes de levadura:

6. Añadir al precultivo 100 ml de YPD e incubar a 28/30°C durante 4-5 h a 250 rpm, controlando la  $DO_{600}$  mediante un espectrofotómetro; parar el cultivo cuando se alcance una densidad óptica de células de 0,4-0,6.
7. Dividir el cultivo en dos tubos estériles (tipo falcon) y centrifugación a 2500 rpm, 5 min, a temperatura ambiente.
8. Descartar la fase acuosa superior de ambos tubos y resuspender el sedimento de uno

de ellos en 25 ml de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> autoclavada (este lavado permite recuperar mayor cantidad de células). Transferir el contenido de ese tubo al otro. Centrifugar a 2500 rpm, 5 min, a temperatura ambiente.

9. Descartar la fase acuosa superior y dejar secar el sedimento obtenido.
10. Preparar la solución de 1xTE/LiAc (fresca en cada uso): 1ml 10XTE, 1ml 10XLiAc y 8 ml de H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.
11. Resuspender suavemente el sedimento en 500 µl de 1xTE/LiAc

Una vez obtenidas las células competentes de levadura, es aconsejable transformarlas el mismo día. La transformación de levaduras se realizó siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio tal y como se describe a continuación:

#### Transformación de levaduras:

Toda la transformación se ha de realizar en condiciones estériles.

1. En frío, añadir en un tubo de microcentrífuga: 100 µl de células competentes, 1 µg del plásmido abierto que queremos integrar en el genoma de la levadura y 10 µl de DNA de espermatozoos de salmón (10 mg/ml) previamente desnaturalizado.
2. Preparar la solución de PEG/LiAc: PEG 50% (p/v), 10x LiAc y 10x TE, en proporción 24:3:3
3. Añadir 600 µl de la solución de PEG/LiAc y agitar en vórtex a alta velocidad durante 10 s.
4. Incubar a 30°C durante 30 min, en agitación a 200 rpm
5. Añadir 70 µl de DMSO e invertir el tubo para homogeneizar
6. Aplicar un choque térmico a 42°C durante 15 min
7. Dejar en hielo 2 min
8. Centrifugar a 5000 rpm durante 1 min
9. Eliminar la fase acuosa superior y resuspender las células en 200 µl de 1xTE

Estas células se sembraron en placa en medio mínimo selectivo (SD) suplementado con todos los aminoácidos excepto con el que complementa la auxotrofia de la cepa no transformada.

## **2.8 Transcripción inversa (RT)**

La transcripción inversa permite la obtención de DNA de tipo complementario (cDNA) a partir de RNA, mediante la enzima retrotranscriptasa. Con el objetivo de obtener cDNA para posteriores reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), se incubó RNA, previamente tratado con DNasa, (normalmente 800 ng-1,5 µg), a 65°C durante 5 min., con una mezcla de oligonucleótido (50 µM oligodT y 10 mM dNTPs). Posteriormente, se añadieron inhibidores de RNasa (RNaseOUT), DTT y la enzima *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.8.1 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Para el análisis de la expresión génica se realizaron reacciones de RT seguidas de PCRs cuantitativas en tiempo real (RT-qPCR). La PCR cuantitativa (qPCR) permite amplificar y cuantificar con precisión el producto de la amplificación. El molde utilizado ha sido cDNA, obtenido como se ha descrito anteriormente. Los experimentos se realizaron en un aparato *LightCycler® 480* (Roche), utilizando el reactivo *SYBR® Premix ExTaq™* (Takara). Los oligonucleótidos utilizados se encuentran descritos en la tabla 7.

Las reacciones se realizaron siguiendo las siguientes condiciones de amplificación:

Paso	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	94°C	2 min.
2. Desnaturalización	94°C	45 s
3. Hibridación	60°C	45 s
4. Extensión	72°C	X s <sup>6</sup>
5. Repetición X ciclos a partir del paso 2 <sup>7</sup>		
6. Extensión final	72°C	5 min.

**Tabla 32. Condiciones estándar para amplificación de fragmentos de DNA por PCR cuantitativa.**

La mezcla de reacción empleada se especifica a continuación:

- *SYBR® Premix ExTaq™* (Takara) 0.3-0.5  $\mu$ M de cada par de oligonucleótidos específicos del gen a amplificar

- Entre 2 y 4  $\mu$ l de cDNA, dependiendo de la concentración calculada previamente.

El volumen final de reacción ha variado entre 14-20  $\mu$ l, dependiendo del experimento.

Para cada reacción se realizaron tres réplicas técnicas. Además, se realizaron los siguientes controles:

- control de DNA genómico (RT-): muestra de RNA no tratada con enzima retrotranscriptasa; si hubiera amplificación en esta muestra indicaría la presencia de DNA genómico.

- control sin molde (NTC): muestra sin ácidos nucleicos, se añade agua en su lugar; si hubiera amplificación en esta muestra indicaría una posible contaminación de la muestra o una formación de dímeros de los oligonucleótidos.

El gen de referencia sobre el que se calcula la expresión de los genes de interés ha sido la *UBIQUITINA10 (UBQ10)*.

Se muestran a continuación las fórmulas para el cálculo de la expresión relativa, a partir del método de comparación de Ct (Livak & Schmittgen, 2001), teniendo en cuenta el promedio de Ct de tres réplicas técnicas, tanto para los genes de referencia como para los de interés. Con este método se puede calcular el nivel de cambio, conocido como  $\Delta\Delta$ Ct. para cuantificar la expresión relativa del gen de interés respecto al gen de referencia.  $\Delta$ Ct es (Ct gen diana – Ct gen ref);  $\Delta\Delta$ Ct es ( $\Delta$ Ct muestra -  $\Delta$ Ct control). Para las representaciones gráficas se ha utilizado el cálculo de  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

<sup>6</sup> El tiempo es variable dependiendo de la longitud del fragmento a amplificar (a razón de 1kb/min.).

<sup>7</sup> Normalmente, entre 28-35 ciclos.

### 2.8.2 Northern blot

Se han utilizado plantas de 10 días de plantas silvestres (Col-0), *tem1 tem2* y 35S::TEM1, recogidas a ZT8 y ZT18 y cultivadas en condiciones de LD.

1. Preparación de las muestras y electroforesis en gel de formaldehído
  - a. Preparación del gel de poliacrilamida (17,5%), con la siguiente composición (por gel): Urea (5,25 g), 40% acrilamida/bi-acrilamida 29:1 (5,47 ml), 5X TBE (1,25 ml), H<sub>2</sub>O tratada con DEPC hasta un volumen total de 12,5 ml. Añadir 100 µl 10% persulfato de amonio (fresco) y 4,58 µl de TEMED
  - b. Se parte de una muestra de RNA total de 10 a 20 µg (para miRNAs se baja expresión se puede llegar hasta 50 µg) a la que se añade tampón de carga para RNA (formamida desionizada, 50% final). Se desnaturaliza a 95°C durante 5 min y se mantienen en hielo hasta el momento de cargarlas en el gel. Se añade colorante de carga para ácidos nucleicos 6X en una concentración final 1X
  - c. Carga de las muestras y electroforesis a 120V durante 2 horas.
2. Transferencia de RNA a membrana
  - a. Tinción del gel en bromuro de etidio y lavado con 0,5X TBE. Se puede hacer una fotografía para comprobar que el RNA no está degradado
  - b. Electro-transferencia del gel a membrana de nylon (*Nytran SPC 0,45; Whatman*), utilizando 0,5X TBE, durante 1 h 15 min a 300 mA, en frío
  - c. Fijación a la membrana mediante irradiación ultravioleta utilizando *UV-crosslinker*
3. Marcaje de las sondas
  - a. Se usaron como sonda oligonucleótidos estándar complementarios a los miRNAs de interés. Para el marcaje se utilizó: 3 µl tampón de reacción A de polinucleótido kinasa 10X polynucleotide kinase (*Thermo Scientific*), 2 µl 10 µM oligo, 1 µl 10U/µl polinucleótido kinasa T4 (*Thermo Scientific*), 5 µl 10 µCi/µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP, 19 µl H<sub>2</sub>O
  - b. Incubación de la reacción de marcaje a 37°C durante 1 h.
  - c. Purificación de las sondas mediante columnas *Illustra Microspin G25 (GE Healthcare)*
  - d. Desnaturalización de las sondas a 95°C durante 5 min, y mantenimiento en hielo.
4. Hibridación de las membranas y lavados
  - a. Pre-hibridación de la membrana durante, al menos, 1 hora a 37°C en tampón de hibridación 1X *PerfectHyb Plus* (Sigma)
  - b. Desnaturalización de la sonda radioactiva al tampón de pre-hibridación
  - c. Hibridación de la membrana durante 2 días a 37°C (o/n, para pequeños RNA con alta expresión, como los genes usados en la normalización U6 snRNA y 5S rRNA.
  - d. Lavados de los filtros 2/3 veces durante 15 min con solución de 2x SSC y 0,2% SDS
5. Detección de la señal

Exposición en pantalla *PhosphorImager* (entre 5 min a 2 h para muestras con alta expresión de RNA pequeños; y entre 4 a 8 días, para muestras con baja expresión)

## 2.9 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Se han utilizado plantas de 10 días de plantas silvestres (Col-0) y plantas *35S::TEM1* y *35S::TEM2*, recogidas a ZT18 y cultivadas en condiciones de LD.

### 1. "Crosslinking" (entrecruzamiento covalente)

Se han usado 1-1,5 gr de plantas enteras. Se añade Tampón de Entrecruzamiento, frío (sacarosa 0,4 M, Tris-HCl pH 8,0 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 10mM y formaldehído 1%), y se hace vacío durante 15 min. Para parar la reacción se añade glicina 2 M y de nuevo vacío, 5 min. Lavado y secado de las muestras con agua estéril y papel absorbente y filtrado en telas de nylon (Miracloth) de 80 µm, congelación de las muestras en nitrógeno líquido y posterior molido en mortero. A partir de este punto todo el protocolo se sigue en frío (4°C).

### 2. Extracción de la cromatina

- a. Resuspensión en Tampón de Extracción I, frío (Tris-HCl pH 8,0 50 mM; EDTA 10 mM; SDS 1%), añadiendo inhibidores de proteasas (PMSF 1/100; AntiPAIN 1/500; Leupeptin 1/1000; Aprotinin 1/1000; Pepstatin 1/1000; E64 1/1000).
- b. Centrifugación durante 15 min a 4000 rpm. Descarte del sobrenadante y resuspensión del sedimento en 1ml de Tampón de Extracción I

Se guardó una parte de esta solución para control de sonicación (sin sonicado).

### 3. Fragmentación del DNA

- a. Sonicado del material en 3 ciclos en pulsos de 10 seg. a máxima potencia (40 kHz), con 5 seg. de tiempo de enfriado entre los pulsos. Comprobación de los fragmentos (300-1500 pb) en gel de agarosa al 1,2 %.
- b. Centrifugación corta de 3-5 min a 13000 rpm en frío para eliminar los restos celulares. Opcional: pasar el lisado por filtro de 45 µm.

El sobrenadante se divide en dos tubos nuevo. Una tercera parte se conserva a -80°C para el control de cromatina total (INPUT).

### 4. Inmunoprecipitación

Separación de las muestras en 2 tubos (1 con anticuerpo – Ab- y 1 sin anticuerpo – No Ab). El tubo sin anticuerpo será el control del ruido de fondo. Para ambos tubos: adición de Tampón de Dilución para ChIP (150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA y 16,7 mM Tris-HCl pH8,0) al cuál se añaden los inhibidores de proteasas anteriormente citados.

- a. Para tubo con Ab (+Ab): tampón de ChIP + incubación de la cromatina con 5 µl de anticuerpo anti-HA
- b. Para tubo sin Ab (-Ab): tampón de ChIP sin anticuerpo

Ambos tubos se incuban durante toda la noche (over/night) a 4°C en plato giratorio

### 5. Pre-aclarado de la cromatina y recuperación de los complejos inmunoprecipitados

- a. Preparado de la mezcla de esperma de salmón y agarosa-Proteína A (específica para anticuerpo de conejo), centrifugación de 3 min a 5000 rpm, eliminación del sobrenadante y equilibrado con tampón de Dilución de ChIP

- b. Adición de la proteína A-sefarosa a las muestras +Ab y -Ab e incubación 3 horas a 4°C en agitación
- c. Centrifugación 5 min a 5000 rpm en frío, descarte del sobrenadante
- d. Resuspensión en 1 ml de Tampón de Dilución para ChIP, incubación 10 min a 4°C en agitación
- e. Centrifugación 5 min a 5000 rpm en frío, descarte del sobrenadante y adición Tampón de Dilución para ChIP y centrifugación
- f. Serie de dos lavados con Tampón de Cloruro de Litio (0,25 M LiCl; 1% Nonidet P-40; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% desoxicolato de sodio), con los citados inhibidores de proteasas excepto PMSF
- g. Serie de dos lavados con tampón TE (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA), con los citados inhibidores de proteasas excepto PMSF.
- h. Elución de los complejos inmunoprecipitados con 150 µl de Tampón de Elución (1% SDS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>), sin inhibidores de proteasas
- i. Incubación 30 min a temperatura ambiente con agitación y centrifugación a máxima velocidad durante 1 min. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se añade NaCl 5M, repetir la elución hasta obtener un volumen final de 300 µl
- j. Recuperación del INPUT, conservado a -80°C y adición de Tampón de Elución hasta un volumen final de 300 µl

#### 6. Reversión del "crosslinking"

Incubación de todos los tubos (INPUT, +Ab, -Ab) a 65°C o/n con agitación suave (1400 rpm)

#### 7. Purificación del DNA

- a. Digestión de las muestras inmunoprecipitadas y del INPUT con una mezcla de 6 µl EDTA 0,5 M; 12 µl 1 M Tris-HCl pH 6,5; 2 µl de proteinasa K 10 mg/ml
- b. Incubación a 42°C durante 1 hora, con agitación.
- c. Recuperación del DNA mediante kit de extracción *Qiagen Plasmid Mini Kit* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resuspensión del DNA en 100 µl H<sub>2</sub>O, se usan 2 µl en cada reacción de qPCR.

### **2.10 Tinción histológica para detección del gen reportero GUS**

Las plantas transgénicas generadas en nuestro laboratorio, *pTEM1::GUS* (Castillejo and Pelaz, 2008), se cruzaron con plantas *35S::MIR156* y con plantas *phyB-9* para realizar un ensayo histoquímico de detección de la proteína GUS expresada bajo el control del promotor de *TEM1*. De este modo, pudimos obtener una medida cualitativa y de patrón de expresión de *TEM1* a través de la coloración azul que muestran estas plantas al ser incubadas con la sustancia cromogénica X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-ácidoglucurónico). Para garantizar el ensayo, esta solución debe ser preparada fresca cada vez. Las muestras fueron tratadas inmediatamente después de su recolección de la siguiente manera:

1. Preparación de la solución X-Gluc que contiene: X-Gluc 50 mM en tampón fosfato 50 mM y pH 7; 0,2% (v/v) Triton X-100, ferrocianuro de potasio 0,5 mM y ferricianuro de potasio 0,5 mM.
2. Recolección de las muestras (normalmente plántulas enteras).
3. Inmersión de las muestras en la solución previamente preparada.
4. Infiltración de la solución mediante aplicación de vacío (15-30 minutos dependiendo del tamaño de la muestra).
5. Incubación a 37°C en oscuridad, normalmente toda una noche (12-16 horas).
6. Al día siguiente, se para la reacción lavando el material con concentraciones crecientes de etanol (v/v): etanol al 30%, etanol al 50% y etanol al 70%. Cada lavado se realiza durante 20-30 minutos a temperatura ambiente.
7. El material puede conservarse en etanol al 70% a 4°C o bien, fijarse en una solución fijadora (FAA) de 5% ácido acético glacial, 3,7% formaldehído y 50% etanol absoluto.

### **2.11 Construcción RNAi RAV1/2 para transformación de *P. tremula x tremuloides***

A partir de una búsqueda *in silico* de los posibles genes ortólogos RAV de *P. trichocarpa* (especie secuenciada del género *Populus*), se encontraron los genes *eugene3.00101225* y *gw1.VIII.1153.1*, actualmente descritos como *PtRAV1* (XM002315922) y *PtRAV2* (XM002311402), respectivamente. Debido a su alto grado de similitud y suponiendo que estos pudieran ser redundantes en su función (como ocurre en *Arabidopsis* con TEM1 y TEM2), se decidió realizar una construcción para silenciar ambos genes, escogiendo para ello un vector de silenciamiento basado en la tecnología de RNA interferente (pHELLSGATE12). Se diseñaron oligonucleótidos específicos (RAV RNAi FOR1-BamHI y RAV RNAi REV-XhoI) que amplifican una región que se encuentra entre los dominios AP2 y B3 (conservados en *Populus sp*) y se realizó una PCR para amplificar dicha región a partir de cDNA de *P. tremula x tremuloides*. La figura 6 indica en negrita los oligonucleótidos utilizados, el subrayado los dominios AP2 y B3, y se delimita con un cuadrado la región amplificada.

Los oligonucleótidos fueron diseñados con dianas de restricción BamHI y XhoI, para facilitar la clonación del inserto en el vector de entrada pENTR3C. Tanto el producto de PCR como el vector de entrada se digirieron usando esas mismas dianas de restricción. El producto de PCR digerido y purificado se ligó al vector linealizado.

Después de la transformación de células de *E. coli* tal y como se describe en el apartado 2.4.1, éstas se sembraron en placas con medio selectivo LB-agar y kanamicina (apartado 1.4.3). De las colonias obtenidas se procedió a cultivar inóculos en medio líquido selectivo, y posteriormente, realizar la extracción de DNA plasmídico para confirmar la clonación mediante digestión con BamHI y XhoI. Los plásmidos positivos se secuenciaron.

		<u>AP2 dominio</u>	
<i>PtRAV1</i>		AGAAAAC TCCCTTCTTCTAAATACAAAGGTGTTGTCCCCCAACCAATGGTCGCTGGGGT	360
<i>PtRAV2</i>		AGAAAGCTCCCTTCTCTAAATACAAAGGGTTGTCCCCCAACCAATGGTCGCTGGGGT	337
*****			
<i>PtRAV1</i>		<u>GCACAGATTTACGAGAAGCACCAGCGTGTGTGGCTCGGGACGTTCAATGAAGAAAATGAA</u>	420
<i>PtRAV2</i>		<u>GCACAGATTTACGAGAAGCACCAGCGTGTGTGGCTTGGGACATTCAATGAAGAAGATGAA</u>	397
*****			
<i>PtRAV1</i>		<u>GCAGCAAGAGCCTATGATATTGCTGCTCAGAGATTCCTGGAAGGGATGCCGTGACTAAC</u>	480
<i>PtRAV2</i>		<u>GCAGCGAGAGCCTATGATACCGCTGCGCAAAGTTTCGTGGAAGGGATGCCGTGACTAAC</u>	457
*****			
<i>PtRAV1</i>		<b><u>TTCAA</u></b> GCAAGTTAATGAGACCGAAGATGATGAAATAGAGGCTGCTTTCCTGAACGCTCAT	540
<i>PtRAV2</i>		<b><u>TTCAA</u></b> ACAGGTTAATGAAACTGAAGATGATGAGATAGAGGCTGCTTTCCTGATCACTCAT	517
*****			
<i>PtRAV1</i>		TCAAAGCTGAAATCGTTGACATGTTGAGAAACACACGTCAGCGATGAGCTAGAGCAA	600
<i>PtRAV2</i>		TCAAAGCTGAAATCGTTGACATGTTAAGGAAACATACGTACAGCGATGAGCTAGAGCAA	577
**			
<i>PtRAV1</i>		AGCAAAGGAACCAAGGAGTAACAATGGGGGAAATGGGAAGCAATACAAGAATACAGCA	660
<i>PtRAV2</i>		AGCAAAGGAACCAAGGAGTAACAATGGGGTAAATGGGAAGCAATACAAGAATACAGCA	637
*****			
<i>PtRAV1</i>		AACACGAGAATAATAGTTATGATCATGGTGTGGTTCGGGTGTTGAAAGCGCGTGAACAG	720
<i>PtRAV2</i>		AACATGGGAGTAATAGTTATGACCATGGTGTGGCCGGGTGTTGAAAGCGCGTGAACAG	697
*****			
<u>B3 dominio</u>			
<i>PtRAV1</i>		<u>CTTTTGGAGAAAGCTGTGACTCCGAGTGATGTTGGGAAATTGAATCGGCTTGTGATACCA</u>	780
<i>PtRAV2</i>		<u>CTTTTGGAGAAAGCTGTGACTCCAAGTGACGTTGGGAAATTGAATCGGCTTGTGATACCA</u>	757
*****			
<i>PtRAV1</i>		<u>AAACAACATGCGGAAAAGCATTTCCTTTGCAAAGTACATCAAGCAATAGTACTAAAGGT</u>	840
<i>PtRAV2</i>		<u>AAACAACATGCAGAAAAGCATTTCCTTTGCAGAGTACATCAAGCTGTAGTACTAAGGT</u>	817
*****			
<i>PtRAV1</i>		<u>GTATTGCTTAACTTGAAGATGTGAGCGGCAAAGTGTGGAGGTTTCGTTATTCTTATTGG</u>	900
<i>PtRAV2</i>		<u>GTGTTGCTTAACTTGAAGATATGAGTGGTAAAGTGTGGAGGTTTCGTTATTCTTATTGG</u>	877
**			
<i>PtRAV1</i>		<u>AATAGTAGCCAAAGTTATGTTTGGACAAAAGGGTGGAGCCGATTGTTAAAGAAAAGAAC</u>	960
<i>PtRAV2</i>		<u>AATAGTAGCCAGAGTTATGTTTGGACAAAAGGGTGGAGCCGATTGTTAAAGAAAAGAGC</u>	937
*****			
<i>PtRAV1</i>		<u>TTGAAAGCTGGTGACATTGTTTGGCTTCAAAGATCAACTGGACCTGATAACCAGCTTTAC</u>	1020
<i>PtRAV2</i>		<u>TTGAAAGCTGGTGACATTGTTTGGCTTCAAAGATCAACAGGGCCAGATAAGCAGCTTTAC</u>	997
*****			
<i>PtRAV1</i>		<u>ATTGATTGGAAGCAAGATGCGGGTCCAACAGGTCCAACCGGTTCA-----GATG</u>	1071
<i>PtRAV2</i>		<u>ATTGATTGGAAGCAAGATGCGGGTCCAACAGGTCCAACCGGTTCAACCGGTTCAAGATG</u>	1057
*****			

**Figura 94. Alineamiento de las secuencias de los genes *RAV1* y *RAV2* de *Populus trichocarpa*.** El recuadro indica la zona amplificada para realizar la construcción RNAi. El subrayado indica los dominios AP2 y B3 propios de la familia RAV. Se indican también los oligonucleótidos utilizados para la amplificación en negra.

Se continuó con uno de los plásmidos positivos y comprobados por secuenciación; con éste se procedió a realizar una reacción de recombinación mediante extremos LR con el plásmido pHELLSGATE12, usando la tecnología Gateway®. Después de transformar células de *E. coli* con el producto resultante, éstas se sembraron en placas con medio selectivo LB-agar y espectinomicina (apartado 1.4.3).

De las colonias obtenidas se procedió a cultivar inóculos en medio líquido selectivo, y posteriormente, realizar la extracción de DNA plasmídico para confirmar la reacción de recombinación mediante digestión con BamHI. Las colonias positivas se conservaron a 4°C



hasta la transformación de *A. tumefaciens* en el UPSC, donde continuó el protocolo de transformación de *P. tremula x tremuloides*.

## 2.12 Construcciones para los ensayos de híbrido sencillo

Inicialmente se realizaron cuatro construcciones distintas para los ensayos de híbrido sencillo, dos para el promotor de TEM1 y dos más para el promotor de TEM2. Para ello, delimitamos la región de estudio a los 1400 nt más próximos al ATG (-1400nt), para cada uno de los promotores, partiendo esta secuencia en dos fragmentos solapantes, de unos 700 nt cada uno. Se obtuvieron las construcciones siguientes:

1. Secuencia de 710 nt de la región promotora más próxima al ATG de *TEM1*, comprendida entre los nucleótidos -1 y -711, clonada en el vector final pHISi-1 (pEM9). Denominada "Fragmento 1-pTEM1".
2. Secuencia de 711 nt de la región promotora comprendida entre los nucleótidos -688 a -1399 de *TEM1*, clonada en el vector final pHISi-1 (pEM10). Denominada "Fragmento 2-pTEM1".
3. Secuencia de 689 nt de la región promotora más próxima al ATG de *TEM2*, clonada en el vector de entrada pCRII-TOPO (pEM5). Denominada "Fragmento 1-pTEM2".
4. Secuencia de 716 nt de la región promotora siguiente a la anterior (-700 a -1400) de *TEM2*, clonada en el vector final pHISi-1 (pEM11). Denominada "Fragmento 2-pTEM2".

Los oligonucleótidos usados para amplificar cada una de las secuencias se especifican en la tabla 7; las construcciones con los vectores de entrada y los finales se detallan en la tabla 2, del apartado 1.3.2.

Debido a dificultades técnicas en la amplificación de la región promotora de TEM2 (fragmento 1), esa construcción quedó retrasada respecto a las otras, por lo que decidimos centrarnos en el estudio de las dos regiones del promotor de TEM1, y dejar para más adelante el estudio de TEM2. Así de las cuatro construcciones iniciales, sólo las del promotor de TEM1 (fragmento 1 y fragmento 2) fueron transformadas en levadura y con ellas se realizó el ensayo contra una genoteca de cDNA de *Arabidopsis*.

Se siguió el protocolo descrito en el manual MATCHMAKER *One-Hybrid System User Manual* de Clontech, para la transformación de la cepa de levadura Y187 con cada una de las dos construcciones anteriormente descritas.

Una vez integrado el plásmido en el genoma de la levadura, se testó su autoactivación. Debido a que el vector utilizado pHISi-1 tiene una expresión basal en levaduras cultivadas en medio mínimo selectivo (en ausencia de His, SD-His), se comprobó qué concentración de inhibidor 3-AT era necesaria para evitar ese crecimiento. Para ello se prepararon placas con medio SD-His con concentraciones crecientes de inhibidor 3-AT (0-15-30-40-50 mM).

### 2.13 Ensayo de levadura de híbrido sencillo

El  *mating* entre las cepas de levadura que contenían el cebo (Y187-pEM9; Y187-pEM10) y la presa (AH109-pGADT7rec) se realizó en el laboratorio del Dr. M. Kater en la Università degli Studi di Milano, bajo la dirección de la Dra. Simona Masiero.

La Dra. Masiero es la autora de la genoteca de cDNA, construida a partir de plantas silvestres de  *Arabidopsis*, cultivadas en condiciones estándar y con las que se realizó una mezcla de distintos tejidos recogidos en diferentes momentos del desarrollo. Esa genoteca está clonada en el plásmido pGADT7rec, con la que previamente se había transformado la cepa AH109 (SD-Leu).

La selección de los diploides se realizó mediante cultivo en medio mínimo selectivo (SD-His-Leu), con diferentes concentraciones de inhibidor 3-AT (10-30-40-50 mM) (Fig. 3). Las mismas colonias se cultivaron en cada una de esas concentraciones, y se seleccionaron aquellas que superaban el efecto inhibitorio a concentraciones más altas.



**Figura 95. Escrutinio de los clones positivos obtenidos en el ensayo**  
Crecimiento en 4 concentraciones diferentes (10-30-40-50 mM) de inhibidor 3-AT.

Esas colonias se seleccionaron para secuenciación. Se utilizaron dos métodos para aislar el DNA (1) mediante extracción de DNA de levadura (ver apartado 2.1.3), posterior PCR con oligonucleótidos específicos (Vep46 y Vep48) y secuenciación (Vep47); y (2) mediante transformación de  *E. coli* con el DNA extraído, comprobación por digestión con el enzima de restricción HindIII y secuenciación (Vep 47).

En total se analizaron, aproximadamente, 80-90 clones para las dos construcciones. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante BLASTx.

### 2.14 Oligonucleótidos

A continuación se detallan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, se especifica su secuencia y uso. Su origen es diverso, ya que algunos han sido diseñados en nuestro grupo (mediante método manual –con ayuda de los programas  *OligoCalc* y  *OligoAnalyzer* (IDT

Technologies) - o bien directamente mediante el programa *Primer Express*, mientras que otros son procedentes de trabajos publicados por otros grupos.

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
<b><i>Arabidopsis</i></b>		
SorayaP-LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	PCR
SPelaz LB4	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT	PCR
SorayaP-SM_lines	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGA	PCR
SorayaP-Kan For	AGATGGATTGCACGCAGG	PCR
SorayaP-Kan Rev	GAAGGCGATAGAAGGCCA	PCR
SorayaP-Act8 For	ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA	PCR
SorayaP-Act8 Rev	TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC	PCR
SorayaP-InsTEM1	CGGGCGAAATGTCAAATGTGG	PCR
SorayaP-J5.2	CCGAATTCTCACAAAGATGTTGATAATCGCCT	PCR
SorayaP_5'Ins-rav2	TTACGCCTCTACCGGATGGG	PCR
SorayaP_3'Ins-rav2	GCTTCTTGGAAACACCGTAACGC	PCR
SorayaP-RAV1 For	CTTATACAGGATGGGAAGCGGAT	PCR
SorayaP-RAV1 Rev	GAGTTGTTACGAGCGTGAAAGA	PCR
SVP41For	GACCCACTAGTTATCAGCTCAG	PCR
SVP41 Rev WT	AAGTTATGCCTCTCTAGGAC	PCR
SVP41 Rev Mut	AAGTTATGCCTCTCTAGGTT	PCR
phyB9-1	AGCTAGTGGAAGAAGCTCGATGAGGCCTTG	PCR
phyB9-2	ACCGTCACATTTCACTAAGTCCATGGTACT	PCR
SorayaP-OligodT	CCTAGGCCACTGTGGCCTTTTTTTTTTTTTTTT	RT
SorayaP_UBQ10 RT For	AAATCTCGTCTCTGTTATGCTTAAGAAG	RT-qPCR
SorayaP_UBQ10 RT Rev	TTTTACATGAAACGAAACATTGAACTT	RT-qPCR
SorayaP-TEM1 RT For	ATCCACTGGAAAGTCCGGTCTA	RT-qPCR
SorayaP-TEM1 RT Rev	GAATAGCCTAACCACAGTCTGAACC	RT-qPCR
SorayaP-TEM2 RT For	TGGTCCGAGAGAAAACCCG	RT-qPCR
SorayaP-TEM2 RT Rev	TCAACTCCGAAAAGCCGAAC	RT-qPCR
SorayaP-RAV1 RT For	CACCGGAGAGTTCAAGAAACGA	RT-qPCR
SorayaP-RAV1 RT Rev	GAGTTGTTACGAGGCGTGAAAG	RT-qPCR
SorayaP-CO RT For	TCCATTAACCATAACGCATACATTTT	RT-qPCR
SorayaP-CO RT Rev	CGGCACAACACCAGTTTCC	RT-qPCR
SorayaP_FT RT For	CCATTGGTTGGTGACTGATATCC	RT-qPCR
SorayaP_FT RT Rev	TTGCCAAAGGTTGTTCCAGTT	RT-qPCR
SorayaP_RT-SVP For	GCAACTAACGGAAGAGAACGAG	RT-qPCR
SorayaP_RT-SVP Rev	GAGCTCTCGGAGTCAACAGG	RT-qPCR
FLC_RT-FOR	CGGTCTCATCGAGAAAGCTC	RT-qPCR
FLC_RT-REV	CCACAAGCTTGCTATCCACA	RT-qPCR
TSF-RT-For	GAGTCCAAGCAACCCTCACCAA	RT-qPCR
TSF-RT-Rev	CACAATACGATGAATTCCTCGAG	RT-qPCR
SPL3_RT-For	TGGAGAAACAGACAGAGACACAGAGGA	RT-qPCR
SPL3_RT-Rev	ACGCTTAGCTGGACACAACGAGAGAAG	RT-qPCR
SPL9_RT-For	CAAGGTTTCAGTTGGTGGAGGA	RT-qPCR
SPL9_RT-Rev	TGAAGAAGCTCGCCATGTATTG	RT-qPCR
SPelaz GA3ox1 For	AGGAGAAGGAGCAGCGGAGAAGAGGAG	RT-qPCR
SPelaz GA3ox1 Rev	CATCCCATTACCTCCCACACTCTCACATAC	RT-qPCR
	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	RT-qPCR
SL-RT-miR156	CTGGATACGACGTGCTC	
miR156-qFwd	CGGCGGTGACAGAAGAGAGT	RT-qPCR
Antoine_Stem	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	RT-qPCR
loop_RT_miR172	CTGGATACGACatcgag	
Merche-qFor-miR172-1	CGGCGGTAGAATCTTGATGATG	RT-qPCR
	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCA	RT-qPCR
SL-RT-5S-Merche	CTGGATACGACagggat	
5SFor1Merche	GGATGCGATCATACCAGCACT	RT-qPCR

qRev-universal (Antoine_qRev-miR172)	GTGCAGGGTCCGAGGT	RT-qPCR
SPL9ch rev1	TGGTGGTTGAGCCATTGTAA	ChIP-qPCR
MIR172C-Chip+109fw	AAAATGGTGCCGTCTTGAGT	ChIP-qPCR
MIR172C-Chip+109rev	CTTGATGATGCTCCAACAGC	ChIP-qPCR
SVP41ch for3	GATTTTGGATTTTTGACCCACT	ChIP-qPCR
SVP41ch rev3	TGCAAACCAAATCCACAAAA	ChIP-qPCR
miR156as	GTGCTCACTCTTCTGTCA	Sonda Northern
miR156sense	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	Control Northern
miR172 antisense	ATGCAGCATCATCAAGATTCT	Sonda Northern
miR172sense (Antoine_miR172S)	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	Control Northern
U6	GCAGGGGCCATGCTAATCTTCTGTATCGT	Control Northern
Fragment1 pTEM1 REV	GGTCTAGAATTTGTTGTGTTTGTGAGAGAG	Clonaje Y1H
Fragment2 pTEM1 FOR	GGGAGCTCTTCGTGCATAGATAAGAAGGGA	Clonaje Y1H
Fragment2 pTEM1 REV	GGTCTAGAGGTCCATACAAGAATAGTAGTA	Clonaje Y1H
Fragment1 pTEM2 FOR	CCGAGCTCCTAATGTGGGATATTATTATCCC	Clonaje Y1H
Fragment1 pTEM2 REV2	GGTCTAGATTCAGTTTCTTGAAGATTCTCAC	Clonaje Y1H
Fragment2 pTEM2 FOR	GGGAATTCAAGAAGTGAGGATAGGTTTCATGT	Clonaje Y1H
Fragment2 pTEM2 REV	GGGAGCTCGGATAATAATATCCCACATTAG	Clonaje Y1H
Vep47	CTATTCGATGATGAAGATACCCC	Secuenciación pGADT7rec
Vep46	ACCACTACAATGGATGATG	PCR pGADT7rec
Vep48	GGTTTTTCAGTATCTACGATTC	PCR pGADT7rec
<b><i>Populus</i></b>		
RAV RNAi FOR1-BamHI	gGGATCCaGATGCCGTGACTAACTTCAA	PCR
RAV RNAi REV-XhoI	gCTCGAGaTCACTCGGAGTCACAGCTTTC	PCR
Sela4831 (For 35S)	TGACGTAAGGGATGACGCAC	PCR
Sela4415 (REV attR)	GACCACTTTGTACAAGAAAGCTG	PCR
Oligo(dT) adapter primer	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGT TTTTTTTTTTTTVN	RT
At4g33380-like For	GCGGAAAGAAAACTGCAAG	RT-qPCR
At4g33380-like Rev	TGACAGCACAGCCCAATAAG	RT-qPCR
TIP41 For	GCTGCACTTGCATCAAAAAGA	RT-qPCR
TIP41 Rev	GCAACTTGGCATGACTCTCA	RT-qPCR
18S For	TCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAG	RT-qPCR
18S Rev	CCGTGTCAGGATTTGGGTAATTT	RT-qPCR
PttRAV1 For	ATCGTTGGAGCCTTGTAACATTTT	RT-qPCR
PttRAV1 Rev	CCTCATTCCCCCCTAACCT	RT-qPCR
PttRAV2 For	CCAGCCGGTTCAACCGATTCA	RT-qPCR
PttRAV2 Rev	CCCATTACACCCATTTTCCATCCC	RT-qPCR
PttFT2 For	GGTTGTTTGGGGTCAACATC	RT-qPCR
PttFT2 Rev	CGACAAAAGCTCCATTTCTCTC	RT-qPCR

**Tabla 33. Lista de oligonucleótidos utilizados**

### 3. ANÁLISIS FENOTÍPICOS

#### 3.1 Análisis del tiempo de floración

El parámetro más utilizado para medir el tiempo de floración en *Arabidopsis* es el conteo del número de hojas. Este suele ser expresado como la suma de las hojas totales (hojas de roseta y hojas caulinares) producidas en el tallo principal, excluyendo los cotiledones. Las hojas fueron periódicamente contadas y marcadas con un rotulador permanente hasta que se produjo la completa elongación del tallo. Otro parámetro utilizado para expresar el tiempo de floración es el conteo del número de días, contabilizándolos desde la fecha de siembra hasta que es visible el botón floral a simple vista.

### 3.2 Determinación del inicio de la fase adulta

El inicio de la etapa adulta se determina por la hoja en que se forman los primeros tricomas abaxiales (en la cara inferior del limbo foliar). Las hojas que se forman durante la fase juvenil se caracterizan por presentar tricomas únicamente en la parte adaxial (superior) del limbo. En cambio, las hojas adultas forman tricomas en ambas caras; la primera hoja que muestra tricomas en la cara abaxial se determina como la primera hoja adulta. La suma total de hojas juveniles se considera que representan la duración de la fase juvenil.

Por tanto, para determinar la duración de la fase juvenil y el inicio de la fase adulta, se ha seguido regularmente la formación de las hojas registrando la primera en la que son visibles los tricomas abaxiales.

### 3.3 Determinación de la velocidad de producción de hojas

La relación entre las hojas totales producidas y el tiempo que tardan en formarse (hojas/tiempo), se denomina ratio de producción de hojas totales. Otra manera de expresar si las hojas se forman más o menos rápido es una medida denominada plastocron, que determina el tiempo que tarda en formarse una hoja (días/hojas).

En condiciones de DC, se analizó la producción de hojas nuevas cada 4 días, a partir del día 8 de cultivo en cámara y hasta el día 36 o 68 según la réplica biológica. Se determinó la aparición de una hoja nueva cuando el primordio foliar era visible a simple vista.

### 3.4 Caracterización fenotípica de las líneas *RNAi RAV1/2* en *Populus*

La caracterización fenotípica de los árboles transgénicos se llevó a cabo en dos períodos de tiempo diferentes; la primera caracterización se realizó a los 41 días después de haber sido sembrados en tierra; la segunda se realizó a los 72 días. En ambos casos, los árboles crecían en condiciones de invernadero. De las líneas *RNAi RAV1/RAV2* seleccionadas, se siguió el crecimiento de entre 5-11 árboles por línea, analizando los siguientes rasgos: altura, número de hojas, ramas silépticas, diámetro del tallo en 5 alturas diferentes (en intervalos de 10 internodios empezando por la base), durante tres días consecutivos; en comparación con plantas silvestres de *P.tremula x tremuloides*. Además, se compararon otros rasgos, como la longitud de las estípulas, la longitud y anchura de las hojas, la posición de la primera hoja con tricomas, o la anatomía de los tejidos del tallo mediante cortes transversales y tinción histológica.

## 3. BIOINFORMÁTICA

En este trabajo se han utilizado diferentes bases de datos y recursos bioinformáticos gratuitos y disponibles de forma abierta en Internet. En la siguiente tabla se detalla su nombre y dirección online.

<b>Nombre</b>	<b>Dirección online</b>
The Arabidopsis Information Resources (TAIR)	<a href="http://www.arabidopsis.org">www.arabidopsis.org</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Phytozome	<a href="http://www.phytozome.net/">www.phytozome.net/</a>
Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements (PLACE)	<a href="http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/">www.dna.affrc.go.jp/PLACE/</a>
The Arabidopsis Gene Regulatory Information Server (AGRIS)	<a href="http://arabidopsis.med.ohio-state.edu">http://arabidopsis.med.ohio-state.edu</a>
Fuzznuc (Nucleic acid pattern search)	<a href="http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc">http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/fuzznuc</a>
Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)	<a href="http://arabidopsis.info/">http://arabidopsis.info/</a>
Genevestigator	<a href="http://www.genevestigator.com">www.genevestigator.com</a>
Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL)	<a href="http://signal.salk.edu/">http://signal.salk.edu/</a>
OligoCalc	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>
EMBL-EBI (Multiple Sequence Alignment)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2">www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2</a>
Diurnal (Mockler Lab)	<a href="http://diurnal.mocklerlab.org/">http://diurnal.mocklerlab.org/</a>

**Tabla 34. Lista de recursos bioinformáticos utilizados**

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa *Prism 6* de GraphPad. Para los experimentos de análisis del tiempo de floración, se usó la prueba *t*-Student con dos colas con un intervalo de confianza de entre el 95% y el 99% o ANOVAs de 1-vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

## BIBLIOGRAFÍA GENERAL

### INTRODUCCIÓN y DISCUSIÓN GENERAL

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., ... Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, *309*(5737), 1052–1056.
- Adrian, J., Torti, S., & Turck, F. (2009). From decision to commitment: the molecular memory of flowering. *Molecular Plant*, *2*(4), 628–642.
- Ahn, J. H., Miller, D., Winter, V. J., Banfield, M. J., Lee, J. H., Yoo, S. Y., ... Weigel, D. (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *The EMBO Journal*, *25*(3), 605–614.
- Albert, R. (2005). Scale-free networks in cell biology. *Journal of Cell Science*, *118*, 4947–4957.
- Amasino, R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, *61*(6), 1001–1013.
- An, H., Roussot, C., Suárez-López, P., Corbesier, L., Vincent, C., Piñeiro, M., ... Coupland, G. (2004). CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of Arabidopsis. *Development*, *131*(15), 3615–3626.
- Andrés, F., & Coupland, G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(9), 627–639.
- Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-Like target genes. *The Plant Cell*, *15*, 2730–2741.
- Ayre, B., & Turgeon, R. (2004). Graft transmission of a floral stimulant derived from CONSTANS. *Plant Physiology*, *135*(4), 2271–2278.
- Balasubramanian, S., Sureshkumar, S., Lempe, J., & Weigel, D. (2006). Potent induction of Arabidopsis thaliana flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genetics*, *2*(7), e106.
- Bergonzi, S., & Albani, M. (2011). Reproductive competence from an annual and a perennial perspective. *Journal of Experimental Botany*, *62*(13), 4415–4422.
- Bernier, G. (1988). The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *39*(1), 175–219.
- Blázquez, M. A., & Weigel, D. (2000). Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature*, *404*(6780), 889–892.
- Blázquez, Miguel A., Ahn, J. H., & Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, *33*(2), 168–171.
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., & Nilsson, O. (2006). CO/FT regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, *312*(5776), 1040–1043.
- Castillejo, C., & Pelaz, S. (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology*, *18*(17), 1338–1343.
- Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., & Davies, B. (2010). Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *21*(7), 73–79.
- Corbesier, L., Lejeune, P., & Bernier, G. (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in Arabidopsis thaliana: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta*, *206*(1), 131–137.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., ... Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science*, *316*(5827), 1030–1033.
- Chae, L., Lee, I., Shin, J., & Rhee, S. Y. (2012). Towards understanding how molecular networks evolve in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*(2), 177–84. doi:10.1016/j.pbi.2012.01.006
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, *303*(5666), 2022–2025.

- Cho, H. J., Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, J.-H., Park, C.-M., & Ahn, J. H. (2012). SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in Arabidopsis. *FEBS Letters*, *586*(16), 2332–2337.
- De Montaigu, A., Tóth, R., & Coupland, G. (2010). Plant development goes like clockwork. *Trends in Genetics*, *26*(7), 296–306.
- Demura, T., & Ye, Z.-H. (2010). Regulation of plant biomass production. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(3), 299–304.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C. a, Taylor, J. M., Peacock, W. J., & Dennis, E. S. (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(16), 6680–6685.
- Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T., & Nilsson, O. (2006). GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *The Plant Cell*, *18*(9), 2172–2181.
- Farrona, S., Coupland, G., & Turck, F. (2008). The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *19*(6), 560–573.
- Fowler, S. G., Cook, D., & Thomashow, M. F. (2005). Low Temperature Induction of Arabidopsis CBF1, 2, and 3 Is Gated by the Circadian Clock. *Plant Physiology*, *137*, 961–968.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., ... Putterill, J. (1999). GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *The EMBO journal*, *18*(17), 4679–4688.
- Fowler, S., & Thomashow, M. F. (2002). Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell*, *14*, 1675–1690.
- Franklin, K. a. (2009). Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(1), 63–68.
- He, Y. (2012). Chromatin regulation of flowering. *Trends in Plant Science*, *17*(9), 556–562.
- Hedden, P., & Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, *5*(12), 523–530.
- Hsu, C.-Y., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., ... Yuceer, C. (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(26), 10756–10761.
- Hsu, C.-Y., Liu, Y., Luthe, D. S., & Yuceer, C. (2006). Poplar FT2 Shortens the Juvenile Phase and Promotes Seasonal Flowering. *The Plant Cell*, *18*, 1846–1861.
- Hu, Y. X., Wang, Y. X., Liu, X. F., & Li, J. Y. (2004). Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research*, *14*(1), 8–15.
- Huijser, P., & Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, *138*(19), 4117–29.
- Ikeda, M., & Ohme-Takagi, M. (2009). Identification of novel transcriptional repressors. *Plant and Cell Physiology*, *50*(5), 970–975.
- Jaeger, K. E., & Wigge, P. a. (2007). FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Current Biology*, *17*(12), 1050–1054.
- 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.
- Jansson, S., & Douglas, C. J. (2007). Populus: a model system for plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 435–458.
- Jones, C. S. (1999). An essay of juvenility, phase change and heteroblasty in seed plants. *International Journal of Plant Science*, *160*(S6), S105–S111.
- Jung, J.-H., Seo, Y.-H., Seo, P. J., Reyes, J. L., Yun, J., Chua, N.-H., & Park, C.-M. (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *19*(9), 2736–2748.



- 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.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, *91*, 29–66.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., ... Weigel, D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, *286*(5446), 1962–1965.
- Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, H. S., Huijser, P., & Ahn, J. H. (2012). The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *159*(1), 461–478.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., & Araki, T. (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, *286*, 1960–1962.
- Kumar, S. V., Lucyshyn, D., Jaeger, K. E., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N. P., & Wigge, P. a. (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, *484*(7393), 242–245.
- Kumar, S. V., & Wigge, P. a. (2010). H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in Arabidopsis. *Cell*, *140*(1), 136–147.
- 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.
- Lee, J., & Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, *61*(9), 2247–2254.
- Lee, J., Oh, M., Park, H., & Lee, I. (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. *The Plant Journal*, *55*(5), 832–843.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., ... Yu, H. (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Developmental Cell*, *15*(1), 110–120.
- Liu, C., Thong, Z., & Yu, H. (2009). Coming into bloom: the specification of floral meristems. *Development*, *136*(20), 3379–3391.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., & Schmid, M. (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in Arabidopsis. *Current Biology*, *17*(12), 1055–1060.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., & Schmid, M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *Plos Biology*, *7*(7), 1–15.
- Matsoukas, I. G., Massiah, A. J., & Thomas, B. (2012). Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant & Cell Physiology*, *53*(11), 1827–1842.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A., & Beeckman, T. (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, *40*(12), 1489–1492.
- Michaels, S. D., Himelblau, E., Kim, S. Y., Schomburg, F. M., & Amasino, R. M. (2005). Integration of flowering signals in winter-annual Arabidopsis. *Plant Physiology*, *137*(1), 149–156.
- Mitchum, M. G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., ... Sun, T.-P. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *The Plant Journal*, *45*(5), 804–818.
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K., Hong, C. B., Paek, N.-C., ... Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *35*(5), 613–623.
- Moreno-Cortés, A., Hernández-Verdeja, T., Sánchez-Jiménez, P., González-Melendi, P., Aragoncillo, C., & Allona, I. (2012). CsRAV1 induces sylleptic branching in hybrid poplar. *New Phytologist*, *192*, 83–90.
- Mutasa-Göttgens, E., & Hedden, P. (2009). Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, *60*(7), 1979–1989.

- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., & Nakamura, K. (2001). Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *127*(1), 252–261.
- 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*(808), 1–8.
- Poethig, R. S. (2010). The Past, present, and future of vegetative phase change. *Plant Physiology*, *154*, 541–544.
- Porri, A., Torti, S., Romera-branchat, M., & Coupland, G. (2012). Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods. *Development*, *2209*, 2198–2209.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., & Coupland, G. (1995). The CONSTANS Gene of *Arabidopsis* Promotes Flowering and Encodes a Protein Showing Similarities to Zinc Finger Transcription Factors. *Cell*, *80*, 847–857.
- Ratcliffe, O. J., Bradley, D. J., & Coen, E. S. (1999). Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis*. *Development*, *126*, 1109–1120.
- Riechmann, J. L., & Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry*, *379*(6), 633–646.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S. E., Ditta, G. S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M. F., & Coupland, G. (2000). Distinct roles of CONSTANS target Genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*, *288*, 1613–1616.
- Sawa, M., & Kay, S. A. (2011). GIGANTEA directly activates Flowering Locus T in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(28), 11698–11703.
- Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A., & Imaizumi, T. (2007). FKF and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science*, *318*, 261–265.
- Scortecci, K. C., Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (2001). Identification of a MADS-box gene, FLOWERING LOCUS M, that represses flowering. *The Plant Journal*, *26*(2), 229–236.
- Scortecci, K., Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (2003). Genetic interactions between FLM and other flowering-time genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *52*, 915–922.
- Schmid, M., Uhlenhaut, N., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D., & Lohmann, J. . (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development*, *130*(24), 6001–6012.
- Seo, P., Ryu, J., Kang, S., & Park, C. (2011). Modulation of sugar metabolism by an INDETERMINATE DOMAIN transcription factor contributes to photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *65*(3), 418–429.
- Sohn, K. ., Lee, S. ., Jung, H. ., Hong, J. ., & Hwang, B. . (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.
- Srikanth, A., & Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular & Molecular Life Science*, *68*, 2013–2037.
- Strasser, B., Alvarez, M. J., Califano, A., & Cerda, P. D. (2009). A complementary role for ELF3 and TFL1 in the regulation of flowering time by ambient temperature. *The Plant Journal*, *58*, 629–640.
- Tao, Z., Shen, L., Liu, C., Liu, L., Yan, Y., & Yu, H. (2012). Genome-wide identification of SOC1 and SVP targets during the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *70*, 549–561.
- Thomas, B., & Vince-Prue, D. (1997). *Photoperiodism in plants*. (Academic Press, Ed.) (p. 415).
- 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.
- Valverde, F. (2011). CONSTANS and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering. *Journal of Experimental Botany*, *62*(8), 2453–2463.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*, *303*, 1003–1006.
- Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, *136*(4), 669–687.

- Wang, Y., Hu, Z., Yang, Y., Chen, X., & Chen, G. (2009). Function annotation of an SBP-box gene in Arabidopsis based on analysis of co-expression networks and promoters. *International Journal of molecular Sciences*, *10*(1), 116–132.
- Wang, J.-W., Czech, B., & Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. *Cell*, *138*(4), 738–749.
- Wellmer, F., & Riechmann, J. L. (2010). Gene networks controlling the initiation of flower development. *Trends in Genetics*, *26*(12), 519–527.
- Wigge, P.A. (2013). Ambient temperature signalling in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *23*, 1–6.
- Wigge, P.A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. *Science*, *309*(5737), 1056–1059.
- 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.
- Woo, H. R., Kim, J. H., Kim, J., Kim, J., Lee, U., Song, I.-J., ... Lim, P. O. (2010). The RAV1 transcription factor positively regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, *61*(14), 3947–3957.
- 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.
- Wu, G., & Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development*, *133*(18), 3539–3547.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., & Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant & Cell Physiology*, *46*(8), 1175–1189.
- Yamaguchi, A., Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S., & Wagner, D. (2009). The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Developmental Cell*, *17*(2), 268–278.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 225–251.
- Yanovsky, M. J., & Kay, S. a. (2003). Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *4*(4), 265–75.
- Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature*, *419*(6904), 308–312.
- 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.
- Yasui, Y., Mukougawa, K., Uemoto, M., Yokofuji, A., Suzuri, R., Nishitani, A., & Kohchi, T. (2012). The phytochrome-interacting VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 redundantly regulate flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(8), 3248–63.
- Yoo, S. K., Chung, K. S., Kim, J., Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., ... Ahn, J. H. (2005). CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *139*, 770–778.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Castillejo, C., & Pelaz, S. (2008). The Balance between CONSTANS and TEMPRANILLO Activities Determines FT Expression to Trigger Flowering. *Current Biology*, *18*, 1-6.
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, *19*(6), 1349.
- Fankhauser, C., & Casal, J. J. (2004). Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *The Plant Journal*, *39*, 747-760.
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., et al. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, *39*(8), 1033-1037.

- Hartmann, U., Hohmann, S., Nettesheim, 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.
- Helliwell, C. A., & Waterhouse, P. M. (2005). Constructs and Methods for Hairpin RNA-Mediated Gene Silencing in Plants. In and J. J. R. B. T.-M. in E. David R. Engelke (Ed.), *RNA Interference* (Vol. 392, pp. 24-35). Academic Press.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Nilsson, O., Alden, T., Sitbon, F., Little, C. H. A., Chalupa, V., Sandberg, G., et al. (1992). Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promoter-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging. *Transgenic research*, 1, 209-220.
- Osnato, M., Castillejo, C., Matías-Hernández, L., & Pelaz, S. (2012). TEMPRANILLO genes link photoperiod and gibberellin pathways to control flowering in Arabidopsis. *Nat Comms*, 3, 808.
- Oyama, T., Shimura, Y., & Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes & Development*, 11(22), 2983-2995.
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M., & Chory, J. (1993). Mutations in the Gene for the Red/Far-Red Light Receptor Phytochrome B Alter Cell Elongation and Physiological Responses throughout Arabidopsis Development. *The Plant Cell*, 5, 147-157.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., et al. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Schwab, Rebecca, Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., & Weigel, Detlef. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8(4), 517-527.
- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H., & Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 67(1-2), 183-195.
- Todesco, M., Rubio-somoza, I., Paz-ares, J., & Weigel, Detlef. (2010). A Collection of Target Mimics for Comprehensive Analysis of MicroRNA Function in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, 6(7), 1-10.
- Wang, J.-W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E., & Weigel, D. (2008). Dual Effects of miR156-Targeted SPL Genes and CYP78A5/KLUH on Plastochron Length and Organ Size in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 20(5), 1231-1243.
- Yasui, Y., Mukougawa, K., Uemoto, M., Yokofuji, A., Suzuri, R., Nishitani, A., et al. (2012). The Phytochrome-Interacting VASCULAR PLANT ONE-ZINC FINGER1 and VOZ2 Redundantly Regulate Flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(8), 3248-3263.

**PUBLICACIONES**

---



## Review

## “And yet it moves”: Cell-to-cell and long-distance signaling by plant microRNAs

Esther Marín-González, Paula Suárez-López\*

Centre for Research in Agricultural Genomics, CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Edifici CRAG, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 March 2012

Received in revised form 17 July 2012

Accepted 21 July 2012

Available online 27 July 2012

## Keywords:

microRNA

miRNA movement

Long-distance signaling

Cell-to-cell signaling

Phloem transport

## ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are key regulators of numerous genes in many eukaryotes. Some plant miRNAs are involved in developmental and physiological processes that require intercellular or inter-organ signaling. Movement of other small RNAs within plants has been established. Recent findings also demonstrate intercellular signaling by miRNAs and strongly support that a subset of these regulatory molecules move from one cell to another or over long distances. Phloem exudates contain diverse miRNAs and at least two of them, involved in responses to nutrient availability, are transmitted through grafts, indicating long-distance movement. Two miRNAs that regulate developmental processes are present in cells outside their domains of expression. Several results strongly support that one of them moves from cell to cell. Research on a mutant affected in plasmodesmata trafficking indicates that these intercellular channels are required for transmission of miRNA activity to adjacent cells. Moreover, ARGONAUTE proteins might be involved in the regulation of miRNA trafficking. Hypothesis on the features and mechanisms that may determine miRNA mobility are presented. Future challenges include identifying other mobile miRNAs; demonstrating that miRNA movement is required for non-cell autonomous action; and characterizing the mechanisms of translocation and genetic pathways that regulate miRNA movement.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction	18
2. Cell-to-cell signaling by plant miRNAs	19
2.1. miR390 acts non-cell autonomously	19
2.2. Intercellular signaling by miR165/166	20
2.3. The miR390 pathway regulates miR165/166	21
3. Long-distance movement of plant miRNAs	21
3.1. miRNAs are present in phloem exudates	21
3.2. miR399 is a long-distance signal for phosphate homeostasis	23
3.3. Other stress-induced miRNAs	24
4. Hypothetical movement of other miRNAs	24
5. How do miRNAs move?	25
5.1. Features of miRNAs that may affect movement	25
5.2. Other factors that may affect movement	26
5.3. Which is the mobile species?	26
5.4. Movement pathways and mechanisms	27
6. Conclusions and future prospects	28
Acknowledgments	28
References	28

## 1. Introduction

Since the first reports of microRNA (miRNA) from the nematode *Caenorhabditis elegans* in 1993 [1,2], our knowledge of the biogenesis, functions and mechanisms of action of small non-coding RNAs has rapidly advanced. Small RNAs are produced from

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 5636600x3110; fax: +34 93 5636601.

E-mail address: [paula.suarez@ragenomica.es](mailto:paula.suarez@ragenomica.es) (P. Suárez-López).

double-stranded RNA (dsRNA) precursors or from single-stranded RNA (ssRNA) molecules that fold into a structure that is partially double stranded. In plants, these precursors are cleaved by DICER-LIKE (DCL) ribonucleases, generating 21–24 nt RNAs. Small RNAs are loaded into RNA-induced silencing complexes (RISCs), which contain a member of the ARGONAUTE (AGO) protein family and direct the small RNAs to complementary RNAs or DNAs. RISCs silence gene activity by at least three mechanisms: mRNA cleavage, inhibition of translation and chromatin modification through DNA methylation [3–6]. Small RNAs are involved in virtually all aspects of plant biology, including development, responses to biotic and abiotic stresses, nutrient allocation and maintenance of genome integrity [7–9].

There are two main classes of small RNAs in plants: small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs (miRNAs) [3–6]. siRNAs are produced from dsRNAs derived from endogenous repeated sequences, convergently transcribed RNAs or transposons, or from exogenous transgenes and viral sequences. Most of these dsRNAs are diced by DCL2, DCL3 or DCL4, producing 21, 22 or 24-nt siRNAs, which are sorted into AGO1, AGO4, AGO6 or AGO9 RISCs that induce transcriptional or post-transcriptional silencing of complementary sequences [5,10]. Long (30–40 nt) siRNAs also exist [11] and binding of these or other siRNAs to additional AGOs has been shown [11–13].

*MIRNA* genes are transcribed by RNA polymerase II as primary transcripts (pri-miRNAs), which contain a hairpin structure and are usually cleaved by DCL1, yielding pre-miRNAs. These are cleaved again by DCL1 producing a duplex comprising the mature miRNA imperfectly base-paired to a miRNA\* strand. Mature miRNAs, which are approximately 21-nt long, are usually incorporated into AGO1-containing RISCs that silence endogenous mRNAs [3,6]. Longer miRNAs processed by DCL3 and sorted into AGO4 complexes have also been reported [14]. A few miRNAs bind to transcripts produced from endogenous non-coding genes, known as *TAS* genes, which are also transcribed by RNA pol II. Upon binding of a miRNA, *TAS* transcripts are cleaved by an AGO1 or AGO7-containing RISC. The cleaved RNA is used as a template by an RNA-dependent RNA polymerase, RDR6, producing a dsRNA, which is in turn cleaved by DCL4 giving rise to several phased 21 nt siRNAs, called trans-acting siRNAs (tasiRNAs). TasiRNAs target transcripts unrelated to their precursors through binding to AGO1 [4,6].

The intricate miRNA world includes: (a) families of very closely related miRNAs; (b) identical mature miRNAs encoded by different genes; (c) transcriptional regulation of *MIRNA* genes; (d) differential processing of precursors; (e) targeting of multiple genes; (f) sequential action of miRNAs; (g) production of tasiRNAs; (h) target mimics, which are non-coding RNAs that sequester miRNAs through partial complementarity; (i) alternative splicing of target mRNAs that can delete or create miRNA binding sites; and (j) several modes of RNA silencing [6,15–17]. More richness has been added to this landscape with the recent finding that miRNAs can act in a non-cell autonomous manner, that is, in cells in which they are not produced (reviewed in [7,18]).

Intercellular communication, mediated by diverse molecules, is essential for coordinated development and responses to environmental challenges [19–23]. Much evidence has accumulated on short- and long-range movement of siRNAs [5,10], but in the case of miRNAs there were reports suggesting that they could act non-cell autonomously within a short range [24–27], and others indicating that they act only in the places where they are produced [28–30]. This has led to the general assumption that miRNAs act mostly in a cell autonomous manner [6,30,31].

This review focuses on recent reports that question this view by providing strong evidence of short and long-distance signaling by plant miRNAs, and indicating movement of these small RNAs [24,32–39].

## 2. Cell-to-cell signaling by plant miRNAs

Plasmodesmata, the channels that connect the cytoplasm of adjacent cells, allow the passive diffusion of water, small solutes and the selective intercellular movement of macromolecules and viruses [40]. Plasmodesmal aperture, or size exclusion limit, varies among tissues, developmental stages and environmental conditions and can be modified by actin filaments, myosin, regulatory proteins and callose deposition in the surrounding cell wall [40,41]. Both mRNA and siRNA move from cell to cell and data suggest that this movement occurs through plasmodesmata [5,10,42]. The first proposals that a miRNA can translocate to adjacent cells came from studies of miR165/166 in maize and *Arabidopsis thaliana* [25,26]. In addition, the effects of some artificial miRNAs are evident outside their expression domains [24,27]. Recent results strongly support the notion that endogenous miRNAs move intercellularly.

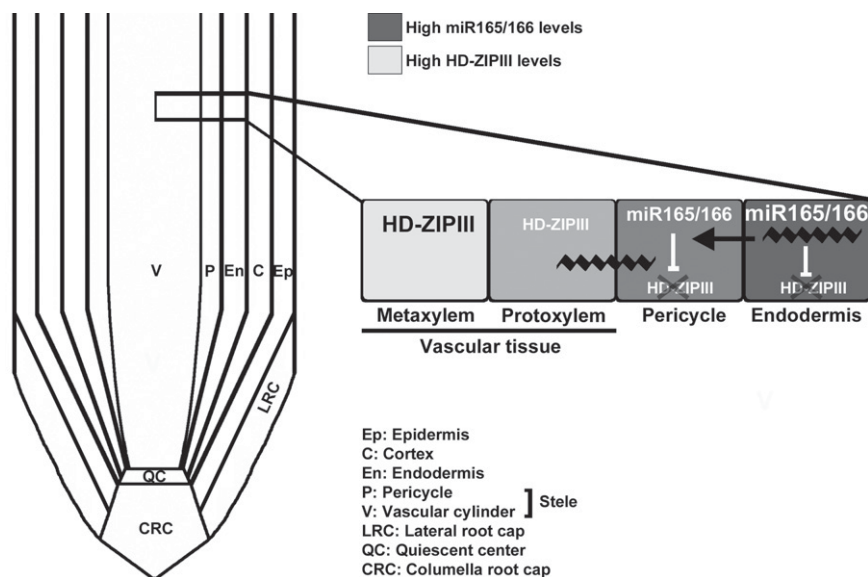
### 2.1. miR390 acts non-cell autonomously

Several developmental events involve the action of miR390, which can be derived from one to four loci (*MIR390a*, *MIR390b*, *MIR390c* and *MIR390d*) in different plants. The mature miR390 species produced from these genes are identical. miR390-guided cleavage of non-coding *TAS3* transcripts depends on a specific RISC that contains AGO7 [4,6]. This cleavage triggers the production of tasiRNAs, a subset of which, named tasiR-ARFs, target three members of the transcription factor family AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF), ARF2, ARF3 and ARF4. The miR390/*TAS3*/tasiR-ARF/ARF pathway plays roles in dorso-ventral leaf patterning, juvenile-to-adult phase transition, floral organ development and lateral root development [35,43–45]. Although single *Arabidopsis ago7* mutations do not alter adaxial/abaxial (upper/lower) leaf patterning [46], they cause leaf polarity phenotypes in combination with mutations weakly affecting leaf morphology [44,47]. Maize mutants defective in tasiR-ARF biogenesis also exhibit radialized leaves [48,49].

To determine whether mobility of small RNAs contributes to specification of the adaxial/abaxial polarity in leaves, the places of expression and activity of tasiR-ARFs were compared with those of the factors required for tasiR-ARF production in *Arabidopsis* [33]. The miR390 precursor loci, *MIR390a* and *MIR390b*, are transcribed in the vascular system and pith region below the shoot apical meristem, but not in the meristem itself or very young leaf primordia. In developing leaves they are expressed preferentially on the adaxial side. Both transcripts also accumulate on the abaxial epidermis of leaves, a place where their transcription is not detected. This may suggest movement of the precursors, although the authors propose differential processing between the epidermis and the underlying cells. Mature miR390 is present where its precursors accumulate, but also in the shoot apical meristem and throughout very young leaf primordia, strongly suggesting that this miRNA is a mobile molecule [33]. In addition, a lack of agreement between the accumulation of miR390 precursors and mature miR390 in the maize shoot apex suggests that this miRNA might also move in maize [37].

The mobility of miR390 has also been explored in roots. Lateral root formation is initiated from pericycle cells in response to the local accumulation of auxin [50]. miR390 is initially expressed before the initiation of lateral root primordia and then extends and overlaps with auxin accumulation. As the lateral root primordium develops, miR390 expression is restricted to the base and flanks of the primordium and is excluded from the centre. However, specific miR390 activity is detected in the whole primordium, indicating that miR390 acts beyond its domain of expression. This suggests that miR390 moves across a few cells in the root [35]. Other research, however, indicates that miR390 might be expressed in the





**Fig. 1.** Cell-to-cell transmission of miR165/166. *MIR165/166* genes are transcribed in the root endodermis. Their products, probably mature miR165/166, move to the adjacent cell layers, becoming progressively less concentrated as they move further away. High levels of miR165/166 suppress *HD-ZIP III* mRNA accumulation in the endodermis and pericycle. Moderate abundance of miR165/166 allows the accumulation of low levels of HD-ZIP III and lead to specification of protoxylem in the periphery of the stele. In the centre of the stele there are very low levels of miR165/166 and therefore high levels of HD-ZIP III, which specify metaxylem. Arrows indicate movement and a line ending in a bar indicates down-regulation.

whole primordium [51] and, therefore, additional work is required to test whether miR390 moves in roots.

Results indicating that tasiR-ARFs probably move in leaf primordia and the shoot apical meristem [31,33], and that they act in root cells in which *TAS3* is not transcribed [35] have been reported. Since non-cell autonomous activity of tasiRNAs is also supported by other works [24,30] and *TAS3* transcripts do not move in leaves [33], it seems plausible that tasiR-ARFs, rather than *TAS3* transcripts, are transmitted from cell to cell.

Although intercellular traffic of tasiRNAs is more widely accepted than that of miRNAs [6,7,30,31], the experimental support for cell-to-cell transfer of miR390 and tasiR-ARFs in shoot apical meristem and leaf primordia is similar [31,33,37]. Both accumulate and act in places in which their precursors are not detected. Therefore we do not find any objective reason to give more credibility to the movement of tasiR-ARFs than to that of miR390 in the shoot apex. The use of sensor constructs that carry miR390 or tasiR-ARF binding sites in the context of a reporter sequence completely unrelated to the endogenous target transcripts [31,35] is a good strategy to exclude the possibility of indirect effects on their targets. Further experiments, however, are required to fully demonstrate that miR390 and/or tasiR-ARFs are transmitted and to test the relevance of this movement.

## 2.2. Intercellular signaling by miR165/166

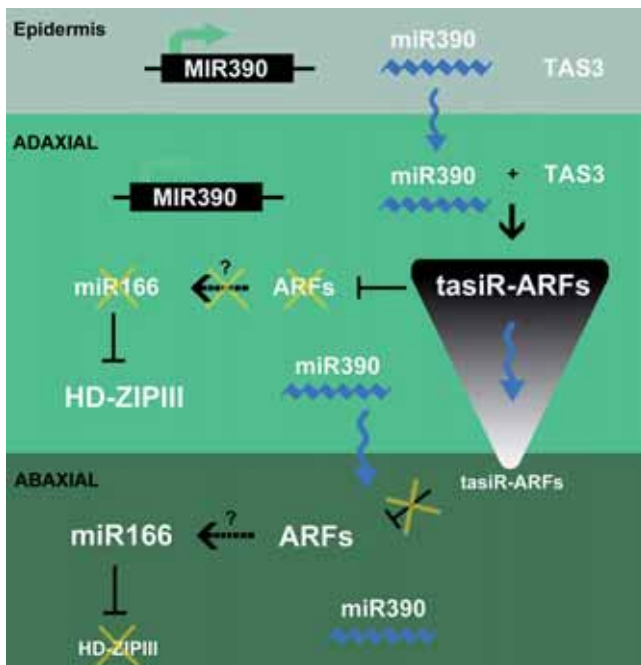
Several *Arabidopsis* genes encode miR165 and miR166, which differ by a single nucleotide. In other species, like maize, several *MIR166* genes also exist, but miR165 has not been found. These miRNAs are involved in meristem formation, establishment of adaxial/abaxial leaf polarity, radial root patterning and vascular specification through down-regulation of class III homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP III) transcription factors [21,52]. At very early stages of maize leaf development, miR166 accumulates mainly on the abaxial side and, as leaves develop, it extends to a broader domain, forming a gradient from the abaxial to the adaxial surface [25]. This gradient, together with the presence of miR165/166 in phloem cells and the effect of *ago1* mutations on the spatial distribution of miR165/166, led to the proposal that this

miRNA might move from its site of expression [25,26]. This hypothesis has received very strong support from several papers that study the function of miR165/166 in root patterning [32,36,39].

Reciprocal signaling between the vascular tissue and the surrounding cell layers in *Arabidopsis* roots specifies the patterning of root tissues. This signaling is achieved through the movement of a transcription factor in one direction and a miRNA in the opposite direction [32]. Approaches similar to those employed for miR390 and tasiR-ARFs (see above) were elegantly combined with genetic analyses of miR165/166 targets and genes regulating transcription of *MIR165/166* precursors [32]. *MIR165a* and *MIR166b* are transcribed mainly in the endodermis and there is no detectable transcription in the pericycle. Mature miR166 accumulates and is active not only in the endodermis, but also in the surrounding cell layers. This strongly suggests that miR165/166 moves from the endodermis to adjacent cell layers. Thus, miR165/166 suppresses *HD-ZIP III* mRNAs in the pericycle and endodermis and restricts the activity of these transcription factors to the vascular cylinder. This restriction is required for proper xylem patterning, such that a high dose of *HD-ZIP III* specifies metaxylem at the centre of the vascular cylinder and a low dose specifies protoxylem in the periphery [32] (Fig. 1). Expression of the remaining *MIR165/166* genes was not detected by one group in roots [32], but other reports showed that *MIR166a* and *MIR166g* are expressed there [36,53]. *MIR166a* is specifically expressed in the endodermis and quiescent centre [36]. A detailed analysis of the expression pattern of *MIR166g* in root tissues would be required to rule out that mature miR166 present outside the endodermis derives from expression of this precursor.

Experiments using a mutated form of a *MIR165* gene (*MIR165mu*) and a mutated version of the miR165/166 target gene *PHABULOSA* (*PHB*) bound by miR165mu indicate that mobile *MIR165* gene products generated in the endodermis exert their function in recipient pericycle and xylem cells [36]. This is corroborated by the fact that ectopic expression of miR165 in the stele is sufficient to down-regulate *PHB* and cause protoxylem development in the place of metaxylem, a phenotype observed in double or triple *hd-zip III* mutants [32,36]. The effect of a mutated *MIRNA* gene beyond its domain of expression is a demonstration that *MIRNA* gene products move, although this does not demonstrate





**Fig. 2.** Model for the regulation of adaxial/abaxial determination of leaves. Transcription of *MIR390* loci in the epidermis and adaxial part of the developing leaf produces mature miR390, which is probably transmitted to almost the whole primordium. MiR390 binds to *TAS3* transcripts, triggering the formation of tasiR-ARFs in the adaxial domain. TasiR-ARFs down-regulate ARF transcription factors on the adaxial side and move to the abaxial domain, creating a gradient distribution that establishes the adaxial/abaxial boundary and limits ARF accumulation to the abaxial domain. Down-regulation of miR165/166 on the adaxial side by tasiR-ARFs, presumably through the repression of ARFs, which would act as inducers of miR165/166, allows the accumulation of HD-ZIP III transcription factors, which determine adaxial fate. TasiR-ARFs are not produced in the abaxial domain, due to the absence of *TAS3* and *AGO7* in this part of the leaf primordium. Very low levels or absence of tasiR-ARFs in the abaxial part enable accumulation of ARFs and miR165/166, which down-regulates HD-ZIP III. ARFs specify abaxial fate. Wavy arrows indicate movement, dashed arrows indicate hypothetical positive regulation and lines ending in a bar indicate down-regulation.

translocation of the mature miRNA. It can also be argued that the use of a mutated *MIRNA* gene does not necessarily reflect what the endogenous gene does. However, together with all the other evidence pointing to movement of mature miRNAs, the transmission of the effect of miR165mu from cell to cell makes a strong case for the movement of mature miRNA.

### 2.3. The miR390 pathway regulates miR165/166

MiR390, together with *TAS3*/tasiR-ARFs, and mature miR166 localize in essentially complementary domains in young leaf primordia of maize [37,48]. Analysis of the accumulation of *MIR166* primary transcripts and mature miR166 in a mutant defective in tasiRNA production indicates that the miR390/tasiR-ARF pathway is involved in the regulation of miR166 expression [48]. The following model has been proposed (Fig. 2): the distribution of miR390, which might result in part from intercellular movement, together with the localization of factors involved in tasiRNA biogenesis, would determine the production of tasiR-ARFs on the adaxial side of the leaf. These small RNAs move from the adaxial to the abaxial leaf domain, establishing a gradient along the adaxial/abaxial axis. This gradient accurately defines the adaxial/abaxial boundary and limits the spatial localization of ARF proteins and miR166 to the abaxial side. ARFs specify abaxial fate and miR166 restricts the HD-ZIP III transcription factors, which specify adaxial fate, to the adaxial domain [33,37,48]. Thus, the difference between the adaxial and abaxial regions of the leaf would be, at least in part, a

consequence of the movement of small RNAs. It will be interesting to test whether miR165/166 moves in leaves, as had been suggested [25,26], although, in principle, the tasiR-ARF gradient might establish an opposite miR166 distribution pattern. Expression of a viral protein that affects cell-to-cell trafficking causes severe defects in leaf polarity [54], which is consistent with the notion that small RNAs move in leaves.

By moving from cell to cell, a small RNA may act as a morphogenetic signal that establishes patterns of cell specification by creating boundaries that limit the activity of target genes [33,36,37]. In some cases, a threshold level below which the miRNA is not able to silence its targets may exist. Computational predictions indicate that miRNA gradients can help define sharp boundaries for miRNA targets [55]. This seems to be the case for miR390, tasiR-ARFs and their target ARF3 [33]. The situation seems more complex for miR165/166. The regulation of *PHB* mRNA levels by this miRNA is dose dependent, but the boundaries for the accumulation of the five miR165/166 target genes are different [32,36]. Several possibilities might explain this: different cleavage efficiencies for miRNA-target gene combinations due to different degrees of complementarity; different expression levels of the target genes; or differential mobility of miRNA family members. Future research should address all these questions.

Altogether these results indicate that members of at least two miRNA families, miR165/166 and miR390, together with miR390-dependent tasiRNAs, act non-cell autonomously and probably move [31–33,35–37,39]. However, the techniques used have some limitations that must be taken into account. Firstly, most methods used to detect mature miRNAs do not distinguish between very similar mature miRNAs derived from different genes. Second, it is not yet clear how faithfully the reporter and sensor constructs show the real pattern of miRNA expression or activity. There are inconsistencies between laboratories in the patterns of *MIR390* expression and response to auxin [35,51] and in the expression of several *MIR166* genes in the root [32,36,53]. Third, most of these approaches are not quantitative and are limited by the sensitivity and resolution of detection systems, so that low levels of a miRNA precursor might remain unnoticed. Also, factors other than small RNAs may affect the accumulation of the target or reporter constructs [33]. This highlights the need to use more than one method to confirm the results obtained and to perform additional experiments to test mobility.

## 3. Long-distance movement of plant miRNAs

Plant survival requires an accurate transport of nutrients, water and signaling molecules over long distances. Long-range signaling has a major role in the regulation and coordination of different biological processes, including flowering, leaf and vascular development, resource allocation, pathogen defense and silencing of RNAs. Metabolites, hormones, proteins and nucleic acids, including mRNAs and small RNA species, act as cell-to-cell or systemic signals that provide an efficient exchange of information between tissues [5,10,19,22,56–59]. In this section we discuss the long-range movement of miRNAs. The importance of this transport is related to the function of miRNAs as negative regulators of genes involved in processes that require long-distance signaling [21,23,57,60,61].

### 3.1. miRNAs are present in phloem exudates

The vascular system, in particular the phloem, provides the pathway for the systemic translocation of macromolecules [19,22]. Although long-distance movement of mRNAs through the phloem is well documented in diverse species [22,56], less is known about miRNA movement. Given that phloem sieve elements have lost

**Table 1**  
miRNAs found in phloem exudates of different plant species.

miRNA <sup>a</sup>	Plant species	Collection method	Experimental evidence	Movement	Predicted target genes	Biological processes	References (detection in phloem exudates)
miR156	<i>Brassica napus</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Cucurbita maxima</i> , <i>Lupinus albus</i> , <i>Malus domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, stem-loop RT-PCR	No evidence	SQUAMOSIA promoter-binding protein-like (SPL)	Vegetative phase change, flowering time, plastochron length	[60,62–64,70]
miR159	<i>B. napus</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>L. albus</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, RNA cloning and sequencing, stem-loop RT-PCR	No evidence	MYB transcription factors	Flower development, flowering time	[60,62–64,70]
miR160	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, RNA sequencing, stem-loop RT-PCR	No evidence	Auxin response factors (ARF10, ARF16, ARF17)	Auxin signaling, seed germination, leaf, flower and root development	[60,63,70]
miR162	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, RNA sequencing, stem-loop RT-PCR, microarray analysis	No evidence	DICER-LIKE 1 (DCL1)	Small RNA biogenesis	[60,63,70]
miR164	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>L. albus</i>	Exudates	RNA blot, RNA cloning and sequencing, stem-loop RT-PCR	No evidence	NAC domain transcription factors	Lateral root development, axillary meristem development, leaf development	[60,63,64,70]
miR166	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>L. albus</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, RNA cloning and sequencing, stem-loop RT-PCR	Cell-to-cell	HD-ZIP III transcription factors	Dorso-ventral leaf polarity, radial root patterning, vascular specification, meristem formation	[60,63,64,70]
miR167	<i>B. napus</i> , <i>C. sativus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, stem-loop RT-PCR, microarray analysis	No evidence	Auxin response factors (ARF6, ARF8)	Auxin signaling, development of reproductive tissues	[60,62,63,70]
miR168	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>L. albus</i>	Exudates	RNA blot, RNA cloning and sequencing, stem-loop RT-PCR, microarray analysis	No evidence	ARGONAUTE 1 (AGO1)	Small RNA biogenesis	[60,63,64,70]
miR169	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>L. albus</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, RNA cloning and sequencing, stem-loop RT-PCR, microarray analysis	No evidence	HAP2-like transcription factors	Nitrogen homeostasis, drought tolerance, nodulation	[60,63,64,70]
miR171	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i>	Exudates	RNA blot, stem-loop RT-PCR	No evidence	SCARECROW-like transcription factors (SCL)	Drought responses	[63,70]
miR172	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, RNA sequencing	No evidence	APETALA 2 (AP2) transcription factors	Flower development, flowering time, tuberization, vegetative phase change, cleistogamy	[60,63,70]
miR390	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	RNA blot, RNA sequencing	Cell-to-cell	TAS3	tasiRNA biogenesis	[60,63,70]
miR395	<i>B. napus</i> , <i>L. albus</i>	Exudates	RNA blot, RNA cloning and sequencing	Long-distance (shoot-to-root)	ATP sulfurylases (APS) and SULTR2;1	Sulfate assimilation and allocation	[60,63,64]
miR398	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>M. domestica</i>	Exudates and stylectomy	Stem-loop RT-PCR, microarray analysis	No evidence	Cu,Zn-Superoxide dismutase	Copper homeostasis, oxidative stress responses	[60,70]
miR399	<i>B. napus</i> , <i>C. maxima</i> , <i>L. albus</i>	Exudates	RNA blot, RNA cloning and sequencing, stem-loop RT-PCR, microarray analysis	Long-distance (shoot-to-root)	UBC24 conjugating E2 enzyme (PHO2)	Phosphate homeostasis	[38,60,63,64]

<sup>a</sup> Only miRNAs detected in phloem exudates of at least two species have been included.

their capability to transcribe and translate, the RNAs present in these cells should either be remnants from developing precursor cells or derive from adjacent cells, probably phloem companion cells.

Detailed biochemical, proteomic and transcriptomic analyses have brought advances in the understanding of phloem sap composition [19,22]. The first hint that miRNAs might be systemic molecules in plants was the finding of endogenous populations of these RNAs in phloem exudates of pumpkin, cucumber, castor bean and yucca [62]. The presence of miRNAs in phloem exudates was later confirmed in oilseed rape (*Brassica napus*) [63] and white lupin (*Lupinus albus*) [64]. Phloem exudates were collected by bleeding from incisions made to the vasculature. The species analyzed present spontaneous exudation upon wounding, facilitating collection of large volumes of exudate. As this method is restricted to species that naturally exude, other methods have been used to analyze phloem composition. Chelating agents, such as EDTA, prevent callose formation and occlusion of wounds, providing a quick and easy method for collecting exudates. EDTA-facilitated exudation has been used in analyses of proteomic phloem composition, but there are no data about whether miRNAs have been found by this method. Furthermore, practical problems associated with this method include the impossibility of measuring component concentrations and the induction of artefacts and changes in phloem composition [65].

Another technique, considered the most elegant and least invasive method, is stylectomy, the analysis of phloem exudates from cut stylets of sap sucking insects [66]. It has been successfully employed to detect mRNA in the phloem sap of rice [67] and barley [68,69] and, more recently, to detect miRNAs in apple phloem sap [70]. Due to the selectivity of aphids to feed from sieve elements, solute contamination from adjacent cells is reduced, yielding relatively pure phloem sap. Nevertheless, stylectomy is restricted to plant species on which insects feed and the volume of the exuding drop is very limited [66,69].

All these techniques also have some common disadvantages. They can promote changes in phloem gene expression, especially in genes involved in wound or defense responses. Moreover, contamination from adjacent cells can be a serious problem. In cucurbits, much of the exudate volume from cut stems or petioles derives from the xylem and cut cells and only a small proportion represents real phloem sap [71]. To limit and monitor possible contaminations, it is necessary to exclude the initial drop and check for molecules, such as hexoses and Rubisco, known to be absent in sieve elements. These controls, however, also have limitations [71].

These combined approaches have revealed more than one hundred miRNAs, belonging to tens of families, in exudates of different plants [60,62–64,70]. Although the first drops were discarded in samples collected from incisions or cuts [60,62–64,70] and no small or large RNAs have been detected in xylem exudates [63], it is still possible that some of these miRNAs may derive from contaminating tissues. MiRNAs that are detected in both bleeding and stylectomy samples are more likely to represent phloem sap miRNAs. Exudate miRNAs range in sizes from 16 to 22 nt, although 24-nt miRNAs might also be present [62–64]. The inventory includes some well characterized miRNAs involved in different biological processes, such as development (e.g. miR156, miR159, miR166, miR172, miR390) or responses to nutrient stresses (miR169, miR395, miR398 and miR399) (Table 1). MiR171 has been used as a negative control to rule out contamination from adjacent cells [60]. However, the detection of low levels of miR171 in phloem exudates in two reports [63,70] casts doubts on the convenience of using this miRNA as a control, or suggests that there might have been contamination.

Phloem exudates are enriched in specific miRNAs, e.g. miR156, miR168, miR169, miR390, miR395 and miR399, when compared

with other tissues, such as inflorescence stems, leaves, roots, pods or vascular bundles, while miR167 and miR171 have been consistently found under-represented in exudates and other miRNAs have not been detected [60,63,64,70].

The highly conserved repertoire of miRNAs in phloem exudates of distantly related species, including herbaceous and woody plants [60,62–64,70], suggests a functional role for these miRNAs. However, some differences in exudate composition have been found between plant species. Because miRNAs are strongly influenced by environmental conditions as well as by developmental stage [72], it might be interesting to obtain data from a wide range of species, growth conditions and developmental phases to obtain a complete picture of the miRNA landscape of the phloem sap.

Many phloem exudate miRNAs have been detected in phloem tissue or vascular bundles using other methods [25,33,37,70,73,74]. It has been suggested that miRNAs in sieve tubes may simply represent leakage molecules from adjacent companion cells [60]. However, the lack of clear correlations between miRNA levels in phloem tissues and phloem sap [70] argues against this hypothesis. In addition, not all miRNAs detected in phloem tissue have been found in phloem sap [70], and exudates from different parts of the plant show a different relative composition of miRNAs [64], indicating that entry of miRNAs into the phloem stream must be somehow regulated. The accumulation of specific miRNAs in the phloem exudate suggests that they are there to perform a function, possibly as mobile signals, although this is not necessarily true for all exudate miRNAs. Mobility and systemic signaling have to be examined case by case.

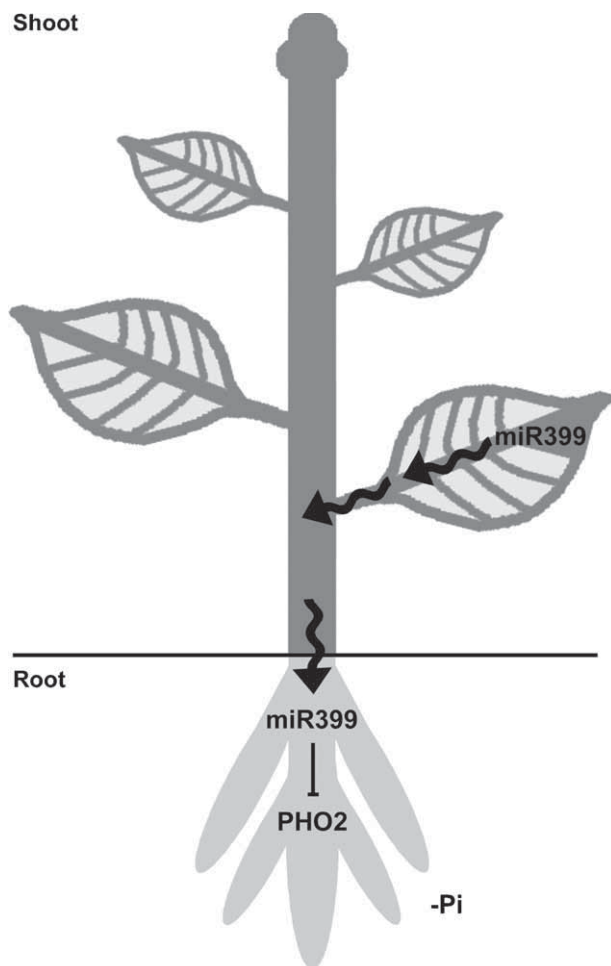
### 3.2. miR399 is a long-distance signal for phosphate homeostasis

Communication from root to shoot, and vice versa, is essential to orchestrate responses to fluctuations in the availability of mineral nutrients. Hormones and nutrients themselves are candidates for long-distance signals controlling mineral macronutrient homeostasis [57]. MiR399 has emerged as an important long-range regulator of inorganic phosphate (Pi) homeostasis. Mature miR399 accumulates to high levels under Pi deficiency, consistent with the suppression of the accumulation of its target mRNA *PHO2* in the roots and the promotion of Pi uptake and translocation [75]. Whereas levels of mature miR399 are similar in Pi-starved shoots and roots [73,76], *MIR399* primary transcripts show much stronger up-regulation in shoots than roots [77]. Furthermore, *MIR399* genes are expressed in the vasculature [73] and, as indicated above, mature miR399 is present in phloem exudates, which show higher miR399 levels in Pi-starved plants [38]. These findings suggested that the pool of mature miR399 in the root might derive in part from the shoot via phloem transport.

To test this hypothesis, *Arabidopsis* miR399-over-expressing shoots were grafted onto wild-type roots (miR399-OX/WT) and mature miR399 massively accumulated in the rootstocks. Low levels of pri-miR399 and miR399\* in roots indicated that the mature miRNA did not derive from *de novo* synthesis of miR399 in roots [34,38]. This indicates that miR399 molecules from the over-expressing scion moved across the graft junction to the wild-type rootstock and cleaved *PHO2* mRNA directly in roots, but also in shoots. However, reciprocal grafts (WT/miR399-OX) did not show evidence of miR399 transport from root to shoot [38]. Two miR399 species, miR399b and miR399f, which differ in two nucleotides, move systemically with similar efficiencies [34].

*Arabidopsis* miR399 also moves in *Nicotiana benthamiana* plants [34]. In addition, accumulation of pri-miR399 and mature miR399 was much faster in shoots (hours) than in roots (days) in Pi-starved wild-type plants. This suggests that movement of miR399 from shoots to roots could suppress *PHO2* at an early stage, a crucial signal for a rapid response to Pi deficiency. However, after prolonged





**Fig. 3.** Long-distance movement of miR399. Under a shortage of phosphate (Pi) miR399 is expressed in the shoot and is transmitted through the phloem to the root, where it down-regulates its target gene *PHO2*. Wavy arrows indicate movement and a line ending in a bar indicates down-regulation.

Pi-starvation, roots expressed sufficient endogenous miR399 to suppress *PHO2* [34].

Despite these results, it remained unknown whether movement also takes place in wild-type plants, in the absence of miR399 over-expression. To address this question, *hen1-1* mutants, which are affected in a methyltransferase required to stabilize miRNAs [6], were used. *hen1-1* mutants show reduced growth, diverse developmental defects and dramatically decreased levels of mature miRNAs [78,79], with no detectable levels of mature miR399 [60]. Grafting of wild-type scions on *hen1-1* mutant rootstocks confirmed the translocation of miR399 through graft unions from wild-type shoots to roots under Pi deficiency, although the effect of the translocated miRNA on its target genes was not tested in this case [60].

These studies suggest that miR399 acts as a long-distance signal that suppresses target gene expression in distal organs under Pi deficiency in several species (Fig. 3). Moreover, the identification of miR399 and *PHO2* orthologs in other plants [77], and the detection of miR399 in phloem exudates of several distant species [38,63,64], suggest that the movement and regulatory network of miR399 could be conserved. However, in order to better prove that the translocation of miR399 is biologically relevant, it should be shown that restricting its movement prevents *PHO2* mRNA degradation in roots and has a consequence in the early response to Pi deficiency.

### 3.3. Other stress-induced miRNAs

Phloem exudate contains, in addition to miR399, a specific set of small RNAs that respond to the lack of essential nutrients, such as sulfate, copper or iron [60]. Similar to miR399, levels of miR395 show a drastic increase in plants grown under S starvation [80], with a higher increase in phloem exudate than in roots, stems or leaves [60], suggesting that its presence in the phloem exudate might be functionally relevant. Several *MIR395* loci are expressed in the companion cells of the root and leaf phloem [81]. MiR395 post-transcriptionally controls the expression of the low-affinity sulfate transporter (*SULTR2;1*) and two ATP sulfurylases (*APS1* and *APS4*) [80,82].

It was examined whether miR395 was able to cross graft junctions in response to S starvation, using WT/*hen1-1* grafts, in an effort to clarify the capacity of miR395 to move. Signals of miR395 translocation between wild-type scions and *hen1-1* mutant rootstocks were observed, consistent with down-regulation of *APS4*, but not of other miR395 targets, in *hen1-1* rootstocks [60]. Despite these results, it is unclear whether transport of miR395 from shoots to roots is necessary for sulfate homeostasis, given that *MIR395* promoter activity in wild-type roots is almost as high as in leaves in S-starved plants [60]. Two possible alternatives were proposed: roots might be unable to produce sufficient amounts of this miRNA; or some organs might respond earlier than others to stress [60]. Furthermore, *SULTR2;1* mRNA is up-regulated in the root vascular system under S deficiency [60,81], contradicting the expected down-regulation of the target gene. Based on the observation that miR395 is expressed in root companion cells, while *SULTR2;1* is mainly expressed in xylem parenchyma cells, the authors suggested a possible repression of the target gene in the companion cells, where *SULTR2;1* expression would be low, restricting its accumulation to the xylem under S starvation. These and other questions have to be investigated in detail in future studies.

MiR398 mediates the response to Cu deficiency and other stresses by directing degradation of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis* [83,84]. MiR398 was not found by sequencing of phloem exudate samples of oilseed rape [63], yet it was detected in these samples by RNA gel blots and microarray analysis [60,63] and transcription of one precursor had been previously observed in the *Arabidopsis* vasculature [83]. Oilseed rape showed up-regulation of miR398 under Cu deprivation in leaf, stem and also in phloem exudate [60,63]. Recent studies have suggested that SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 7 (*SPL7*) might be a central regulator of Cu-deficiency responses, being able to induce the accumulation of miR398, among other miRNAs [85]. Nevertheless, transport of miR398 has not been demonstrated so far.

That miR395 and miR399 can be transmitted through grafts and down-regulate their target genes in recipient rootstocks [34,38,60] supports long-distance movement. It is still unclear whether all miRNAs present in the phloem sap or only some of them may move. In this regard, miR171 has been detected in phloem exudates of oilseed rape and pumpkin [63,70], but it does not seem to move through grafts in *Arabidopsis* [60]. In addition, the lack of graft transmission of the effects of artificial miRNAs expressed using the ubiquitous 35S promoter suggests that expression in the phloem is not sufficient for long-range activity [28]. Taken together, all these results suggest that some miRNAs are systemic regulatory signals, although this has to be further elucidated.

### 4. Hypothetical movement of other miRNAs

Inconsistencies between the accumulation pattern of a miRNA and the transcription of its precursors may suggest movement from

cell to cell, as is the case with miR391 [33]. This miRNA is up-regulated by Pi starvation and, as explained above, Pi homeostasis requires both local and systemic signaling [75,86], but no reports on miR391 movement have been published so far.

MiRNAs present in vascular bundles and, in particular, in the phloem exudate are potentially mobile. A substantial proportion of the miRNAs detected in phloem exudates target genes involved in processes that require systemic signals, such as flowering (e.g. miR156, miR159 and miR172) [87–89], nutrient homeostasis (e.g. miR169, miR395, miR398 and miR399) [57,90] and nodulation (e.g. miR169) [91], pointing to these miRNAs as possible candidates for long-distance regulators of these processes.

Systemic signals for flowering and tuber induction can substitute for each other [92,93], indicating that they are very similar. These signals move from the leaves to the shoot apical meristem for flowering and to underground stolons for tuberization [59,94]. Several FLOWERING LOCUS T (FT) proteins and the plant growth regulators gibberellins (GAs) have been identified as mobile flowering signals [95–98].

In potato, over-expression of miR172 promotes tuberization and this effect is transmitted through grafts. Changes of miR172 levels in stolons, rather than in leaves, correlate with tuberization [99]. These results have led to the proposal that miR172 moves from leaves to stolons or regulates long-distance signals affecting tuber induction. That over-expression of miR172 in stocks is not sufficient to induce tuber formation [99] argues against a role of miR172 as a mobile signal, although it does not rule it out completely. It is possible that repressive signals produced in wild-type scions counteract the effect of over-expressing miR172 in stocks. Alternatively, there might be factors required for processing of the miRNA precursor that act only in leaves. Differential processing of a pre-miRNA in certain cell types has been described in mammals [16], making this hypothesis plausible. MiR172 expressed from a viral promoter seems to move through graft junctions in *N. benthamiana* [100]. However, the results are not conclusive given that only a small fraction of grafted plants showed a slight increase in miR172 levels and, in addition, the miR172 transgene did not have any effect on target genes. Given that miR172 regulates FT in *Arabidopsis* [101], the systemic effect of this miRNA might be mediated by FT.

It has also been speculated that miR172 might be involved in cell-to-cell signaling from mesophyll to phloem companion cells [94], on the basis that the photoreceptor phytochrome B (PHYB) regulates miR172 [99] and is required in mesophyll cells to inhibit FT expression in companion cells [102]. In addition, two miR156 target genes, *SPL9* and *SPL10*, regulate the levels of miR172 [17] and the effect of *SPL9* on vegetative development is non-cell autonomous [103], suggesting that either SPL proteins or downstream factors, e.g. miR172 or FT, might be transmissible.

The phloem exudate also contains miR159, which targets genes involved in GA signaling and affects flowering [87]. In addition, GA regulates miR159 levels indirectly [87]. Although the mechanism by which miR159 affects flowering is not clear [104], it is intriguing that a putatively mobile miRNA affects signaling by a molecule, GA, that acts as a long-distance flowering regulator. This finding deserves more attention.

MiR399 and its target gene *PHO2* are involved in the response of flowering to ambient temperature [105]. As miR399 is a phloem-mobile signal for Pi homeostasis [34,38], it is tempting to speculate that this miRNA might also act as a systemic flowering signal. However, it has not been ruled out that the flowering-time phenotype of miR399 over-expressors or *pho2* mutants is an indirect result of the stress caused by Pi over-accumulation [105].

Two miRNAs present in phloem exudates, miR162 and miR168, target genes involved in miRNA biogenesis, *DCL1* and *AGO1*, respectively [106,107], and another one, miR390, triggers formation of tasiRNAs [6], suggesting that the production of small RNAs might

**Table 2**  
miRNAs found in phloem exudates contain all possible 5' nucleotides.

5' nt	miRNAs found in phloem exudates (examples)	References
A	miR172a-d, miR390a,b	[63]
C	miR169a-c, miR395a-f	[63,64]
G	miR172e	[63]
U	miR156a-f, miR159a, miR162a,b, miR164a-c, miR166a-g, miR319a-b, miR399b,c	[62–64]

itself be modulated by long-distance signals. The detection of miR390 in vascular bundles [33,35,37] and the findings that suggest cell-to-cell trafficking of this miRNA give credibility to the hypothesis that miR390 can reach the sieve tubes. However, no evidence that this miRNA acts as a long-range signal has been reported so far.

In addition to miR390, another miRNA in phloem exudates, miR165/166, is involved in cell-to-cell signaling and has been detected by other methods in the vasculature of several organs [25,32,70]. This suggests that complex mechanisms of short and long-distance regulation may exist, as is the case for Pi homeostasis [75]. However, it is also possible that miRNAs that are both able to move from cell to cell and expressed in phloem companion cells simply leak into sieve elements and do not play a role as systemic signals.

Therefore, a number of miRNAs are putatively transmissible, but further research is needed to determine whether they move.

## 5. How do miRNAs move?

Many questions will have to be answered after establishing that miRNAs can move. In this section, we examine the factors that may affect mobility and the possible mechanisms of transfer.

### 5.1. Features of miRNAs that may affect movement

It has been proposed that differences in miRNA size might influence the capacity to move [7]. Most miRNAs are 21-nt long and all size classes of endogenous and transgene-derived siRNAs move long distances [108,109], with preferential movement of 24-nt over 21-nt siRNAs [109]. Both 21 and 24-nt siRNAs also move from cell to cell [108,110]. Therefore, size is probably not a factor that determines, *per se*, whether a small RNA moves or not, although it is possible that the mobility range is affected by size, perhaps as a consequence of differential interactions with other molecules.

Other features of the *MIRNA* gene, the pri- or pre-miRNA or the mature miRNA itself, such as sequence, secondary structure or stability of the miRNA\* may also have an effect [7]. The 5' nt of small RNAs very often determines into which RISC they will be loaded [6]. It has been suggested that this may affect mobility [6]. However, all possible nucleotides exist at the 5' position in the miRNAs found in phloem exudates (Table 2). Also, the 5' nt of miR165/166 is different from that of miR390 (Table 2). It is very unlikely, then, that the 5' nt establishes whether a miRNA can reach the phloem conduit or move from cell to cell. Results using precursors with different sequences that contain the same mature artificial miRNA indicate that local transmission of miRNA activity from phloem companion cells is independent of precursor sequence [24]. Whether this is also true for other miRNAs and, more importantly, for endogenous miRNAs, remains to be resolved. However, other characteristics of miRNAs may determine preferential interaction with certain AGO proteins [111] and perhaps influence mobility (see below).

Place, time and level of expression can contribute to determine transmissibility. For example, expression in phloem companion cells probably helps miRNAs reach the sieve tubes and commence

long-distance movement. The degree of plasmodesmal connectivity between different cell types is not uniform and varies through development and in response to exogenous factors [40,112]. In addition, there is differential processing of precursors in different cell types or tissues at least in animals [16], and this may affect mobility. It is expected that cell-to-cell trafficking of miRNAs is regulated by interactions with other cell components. These interactions may vary among cells or tissues and may be influenced by the time and level of miRNA expression.

The abundance of endogenous and artificial miRNAs may determine the range of transmission, probably due to dilution effects [24,36]. This may explain the discrepancies between reports that examined the mobility of small RNAs [24,28,30]. For example, a two-construct approach was used to indirectly drive expression of artificial or endogenous miRNAs in specific cell types and the effect of the miRNAs analyzed was not transmitted to neighboring cells [28,30]. However, indirect control of miRNA expression may have led to lower levels of miRNAs than direct control by a cell-specific promoter [24].

Additional work is needed to understand which features make some miRNAs mobile.

### 5.2. Other factors that may affect movement

Given that the composition of the processing machinery is different for different classes of small RNAs and that this determines into which type of RISC they are loaded, it has been hypothesized that the biogenesis pathway and/or the RISC may determine the mobility of silencing signals [6,7]. Work with artificial small RNAs indicates that the ability to act non-cell autonomously does not depend on the biogenesis pathway, although the extent of the non-cell autonomy can be influenced by biogenesis. The miRNAs and siRNAs act within a similar range, whereas the effect of tasiRNAs can spread much further [24]. Conversely, in another report, the mobilities of tasiRNA and siRNA silencing signals were similar, whereas miRNAs acted cell autonomously [30]. Perhaps the use of artificial miRNAs or the expression of natural miRNAs using heterologous backbones or in places where they are normally absent has inadvertently overlooked some of the features affecting movement. This might explain the contrasting results obtained by different laboratories.

Initial movement of primary siRNAs over 10–15 cells from the site in which they are produced can be amplified through the production of secondary 21-nt siRNAs, which move further away [113]. It has been proposed that tasiRNAs could help spread over longer distances the effect of miRNAs with limited or no mobility [6,24,30,31], but clear evidence showing this for endogenous small RNAs has not been obtained so far. As discussed previously, it is not clear, for example, that tasiR-ARFs move more extensively than miR390 [33]. Further research with additional endogenous small RNAs will be required to elucidate whether biogenesis pathways influence the mobility of these RNAs.

Another question that must be addressed is whether miRNAs move as naked RNAs or in complexes with other molecules. On the basis that these small RNAs act in RISCs, bound to proteins, that RNAs are very sensitive to degradation by nucleases, and that RNA binding proteins are involved in cell-to-cell transmission of mRNAs [22,42], it has been assumed that miRNAs may move within ribonucleoprotein complexes, which would protect miRNAs from degradation. However, so far there is no conclusive demonstration that this is the case for any small RNA. AGO1, despite being required for mobile silencing [5], acts cell-autonomously and, therefore, it is improbable that 21-nt siRNAs and miRNAs move bound to AGO1 [110].

A phloem protein from pumpkin, PSRP1, binds single and double-stranded small RNAs and facilitates cell-to-cell movement

of 25-nt small RNAs in microinjection experiments [62]. Whether PSRP1 binds 21-nt miRNAs is not known. This protein is not evolutionarily conserved, what makes improbable that it plays a general role in small RNA movement. Furthermore, no biological function has been reported for PSRP1. The pri-miRNAs of one mobile (miR399) and two putatively mobile miRNAs (miR398 and miR172) interact with FCA, an RNA-binding protein involved in flowering-time control that promotes pri-miR172 processing [114]. Whether this affects miRNA movement has not been tested yet.

A hypothesis on how miRNA movement may be regulated derives from work on the effect of AGO10 on miR165/166 [111]. AGO10 sequesters miR165/166 and prevents interaction of this miRNA with AGO1, precluding miR165/166 function in the shoot apical meristem. Furthermore, *ago10* mutants ectopically accumulate this miRNA in the shoot apical meristem [115]. Therefore, it is possible that regulation of miR165/166 trafficking is achieved, at least in part, through the activity of AGO10. Exploring this hypothesis will undoubtedly help to understand how miRNAs move. Whether this mode of miRNA regulation is specific for miR165/166 or controls other miRNAs that interact with AGO10 [111] is still unknown. Combining *ago10* mutations with reporters of miRNA activity and comparing the expression pattern of *AGO10* with the localization of these miRNAs will help answer the question about whether AGO10 spatially restricts the function of these miRNAs. Structural features of the miRNA:miRNA\* duplex, rather than miRNA sequence, are required for the interaction of miR165/166 with AGO10 [111], pointing to a miRNA trait that might affect mobility. AGO1 is required to confine miR165/166 localization [26] and is associated to peripheral membranes [116]. Given that AGO10 belongs to a protein family present in all higher eukaryotes, perhaps other AGO proteins may play a similar role to AGO10 in restricting miRNA activity.

*IPS1*, the target mimic of miR399, limits the activity of this miRNA by sequestering it [117]. It will be interesting to determine whether the spatial localization of miR399 is regulated by *IPS1*. Perhaps target mimics may restrict movement of miRNAs in a similar way as that proposed for AGO10 [111].

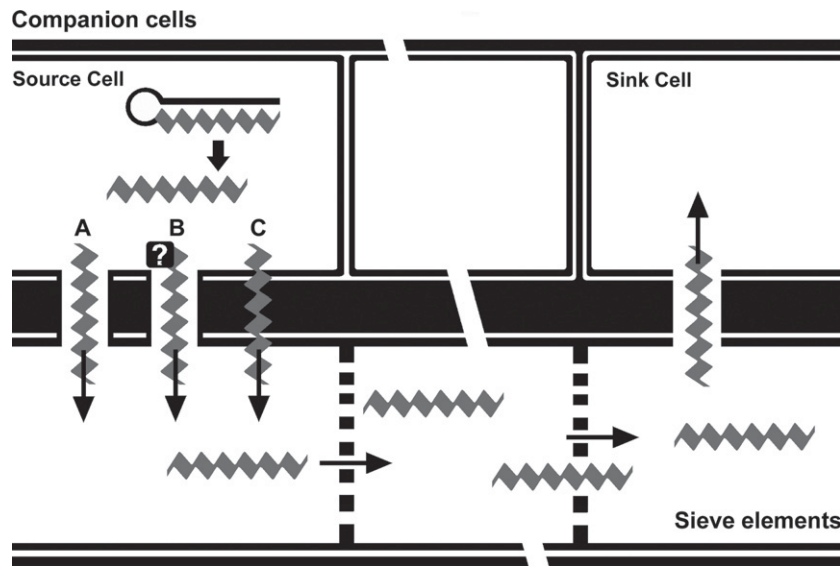
Not only are plant miRNAs mobile, human miRNAs are present in blood plasma, serum and other body fluids in an extracellular form and these circulating RNAs can be used as disease biomarkers [118]. Many plasma and serum miRNAs are present in protein complexes that contain AGO2, and others are found in vesicles [119,120]. In addition, human miRNAs are transferred from one cell to another through extracellular vesicles, probably exosomes, and are functional in recipient cells [121]. The delivery to recipient cells is mediated by lipoproteins and scavenger receptors, which are plasma membrane proteins able to bind lipoproteins and polynucleotides, among other ligands [122,123]. It will be interesting to study whether similar mechanisms operate in plants. Vesicle-mediated transport of molecules has been shown in plants [124] and a role for endolysosomal membranes and exosomes in cell-to-cell and long-distance transmission of miRNAs in plants has been hypothesized [125]. In this regard, the association of AGO1 and AGO7 to membranes is intriguing [116,126].

The most likely scenario is that multiple factors determine whether a miRNA is mobile or not as well as the range of translocation. Mobility is probably regulated in space and time and responds to environmental conditions. In addition, the extent of the influence of different factors on mobility might vary for different miRNAs.

### 5.3. Which is the mobile species?

Two important issues that deserve further attention are whether mature miRNAs or their precursors move and whether miRNAs traffic between cells as single or double-stranded species. In section 2 we have discussed that it is likely that mature miR165/166,





**Fig. 4.** Model for long-distance movement of miRNAs. MiRNAs present in phloem companion cells may use three different mechanisms to move to sieve elements: (A) Passive diffusion through plasmodesmata; (B) active symplastic movement in complexes with other cellular components, e.g. protein or lipids; and (C) apoplastic transmission. Once in the sieve elements, miRNAs move from source to sink tissues with the phloem flow. Exit of miRNAs from the phloem conduit to target tissues has not been shown yet, but in principle it could use similar mechanisms to those for entry into the sieve elements. Arrows indicate movement.

miR390 and tasiR-ARFs, rather than their precursors, move from cell to cell [32,33,35–37], but this is not fully demonstrated yet. As for long-distance movement, these issues are relevant for three steps: entry into the sieve elements, translocation in the phloem stream and exit from the phloem. Which miRNA form enters the sieve tubes is not yet known. The finding of mature miRNAs in phloem exudates of several species [62–64,70] and the results of grafting experiments [34,38,60] suggest that mature miRNAs are transported in the vasculature. It has not been ruled out that pri-miRNAs or pre-miRNAs can move in the phloem, although it seems unlikely because the miRNA processing machinery has not been detected in sieve elements [63].

To identify the mobile silencing signal, small RNAs have been sequenced in stocks of *Arabidopsis dcl2 dcl3 dcl4* triple mutants, which do not produce 22, 23 or 24-nt mature siRNAs, grafted with wild-type scions. Endogenous 23 and 24-nt siRNAs have been detected in the mutant stocks [109], leading to the conclusion that siRNAs, rather than their precursors, are the mobile species [109]. In *C. elegans*, both long and small RNAs act as mobile silencing signals (reviewed in [5]), leaving open the possibility that small RNA precursors can move at least in some organisms.

Regarding the question of whether miRNAs move as ssRNAs or as miRNA:miRNA\* duplexes, the miRNA population of pumpkin phloem exudates is mainly single stranded [62]. However, the presence of miRNA\* strands in the phloem is puzzling [63]. Sequencing results suggest that the abundance of most miRNAs\* is lower than that of the corresponding miRNAs. In addition, RNase digestion experiments indicate that exudate miRNAs are predominantly in a single-stranded form [63]. Although the authors of this work admit that double-stranded molecules might separate during the isolation procedure, the observation that only mature miRNAs and not miRNAs\* increase during stress treatments suggested that single strands, and not miRNA:miRNA\* duplexes are the physiologically relevant molecular species. Yet, graft-transmission of miR399\* from miR399-over-expressing scions has been observed [127]. This may be due to excessive expression of miR399 precursors in the over-expressing plants. Alternatively, it is possible that both miR399 and miR399\* move in wild-type plants, either as ssRNAs or forming a miRNA:miRNA\* duplex.

Using a viral silencing suppressor that specifically sequesters 21-nt siRNA duplexes, movement of silencing signals was inhibited [110], indicating that duplexes are mobile. Bombardment of fluorescently labeled 21 or 24-nt siRNA duplexes confirmed cell-to-cell and systemic movement of these small RNAs, whereas movement of single-stranded siRNAs was not observed [108,110]. By contrast, single-stranded but not double-stranded siRNAs moved from cell to cell when co-injected with an RNA-binding protein [62]. Experiments performed with exogenously supplied small RNAs have to be interpreted with caution, because they can be affected by artefacts and may not necessarily represent what happens with endogenous small RNAs. Therefore, whether single-stranded siRNAs move or not is not clearly established. Also, it is not known to which extent the conclusions on movement of siRNAs can be extrapolated to miRNAs.

#### 5.4. Movement pathways and mechanisms

Intercellular communication can occur via symplastic (through plasmodesmata) or apoplastic pathways (through plasma membranes and cell walls). Restricting movement of molecules through plasmodesmata by increasing callose deposition limits the non-cell-autonomous action of miR165, indicating that plasmodesmata are required for cell-to-cell movement of at least one miRNA [39]. Phloem loading and unloading of small RNAs may, in principle, use pathways similar to those for cell-to-cell movement. The most widely accepted hypothesis is that miRNAs are loaded symplastically through plasmodesmata [7,18,42] (Fig. 4). Plasmodesmata connecting sieve elements with companion cells differ from plasmodesmata that connect other cell types [128]. Therefore, it is possible that symplastic phloem loading and unloading may be different from movement between non-phloem cells.

Given the important roles that miRNAs play in plant biology, and the fact that very few of them seem to move, it is expected that miRNA trafficking is tightly regulated, but this might be achieved either by actively facilitating transport or by restricting free diffusion. It is not known whether miRNAs use passive or active mechanisms to move through plasmodesmata or enter the phloem stream. siRNAs probably move in a passive manner (reviewed in [6]). The size exclusion limit of plasmodesmata is variable and the

size of single-stranded miRNAs, around 7 kDa, would theoretically allow free diffusion between many cell types [129]. Nevertheless, shape may also affect the ability of molecules to freely pass through these channels [41] and the size of miRNAs themselves would be irrelevant if they move in complexes with other molecules rather than as naked RNAs.

As miRNA expression patterns, regulatory mechanisms and modes of action are diverse, it would not be too daring to hypothesize that miRNAs may use more than one translocation pathway. Whether miRNAs can enter the sieve elements through apoplastic loading has not been discarded. In fact, apoplastic movement of small RNAs has been suggested. Results indicate non-cell autonomous effects of endogenous endosperm-derived siRNAs on the developing embryo and movement of transposon-derived siRNAs from the vegetative cell to sperm cells in pollen (reviewed in [7,61]). Given that the embryo is symplastically isolated and sperm cells probably do not have plasmodesmata, it has been proposed that these cases might involve apoplastic movement of siRNAs (reviewed in [5]). Thus, it might be worth testing whether miRNAs can be transmitted apoplastically.

It is assumed that miRNAs reach the sieve elements from adjacent companion cells, but this has not been demonstrated so far. It is not known if some phloem exudate miRNAs can originate in more distant cells. Also, the places in which these miRNAs are processed have not been determined. Results indicate that miRNAs, as well as siRNAs, move with the phloem mass flow, preferentially from sources to sinks [34,38,60,108,109] (Fig. 4). That two miRNAs move through grafts and lead to down-regulation of target genes in recipient stocks [34,38,60] suggests that these miRNAs can exit the vasculature and perform their functions in recipient tissues. However, since these analyses did not distinguish between phloem and other stock tissues, a proof that miRNAs can leave the phloem is not available yet.

Viral movement proteins, which increase the size exclusion limit of plasmodesmata [42], and viral suppressors of silencing, which affect miRNA activity by inhibiting different steps of the RNA silencing process [130–135], could be used as tools to test the mechanisms of miRNA movement.

## 6. Conclusions and future prospects

Evidence supporting the hypothesis that certain miRNAs move has been obtained in several tissues and in several species with a range of experimental approaches. We can almost say with certainty, in relation to miRNA, “and yet, it moves” (“*eppur si muove*”), the sentence that the legend attributes to Galileo Galilei, referring to the movement of the Earth around the Sun, after being forced to deny this theory before the infamous Inquisition. Local transmission only occurs within a few cells, but the fact that miRNAs can also be transported in the phloem suggests that these small RNAs are more mobile than was previously thought. It is probable that more miRNAs will join the list of putative cell-to-cell and long-distance signals. Still, mobility seems to be a specific feature, not a general attribute, of a limited subset of miRNAs.

Additional experiments are required to undoubtedly demonstrate that endogenous miRNAs move and that movement is required for acting at a distance. Methods for the dynamic visualization of small RNAs and their activity will be essential to provide a final proof of miRNA movement. Grafting experiments to test movement of a mutated miRNA from a donor plant to a receptor carrying a complementarily mutated target gene will also be helpful. Mutants affected in intercellular trafficking of macromolecules [39] could be useful tools to test movement of different miRNAs.

The research done so far opens new questions and novel ways to understand the function of miRNAs in plants. The detection of

uncharacterized miRNAs in the phloem exudate can help to address the role of these miRNAs in future studies. More work is needed to identify the mobile species and the features that determine whether a miRNA is mobile or not. Understanding the origins of the discrepancies between results obtained in similar studies will help advance in this field. To fully comprehend the roles of mobile miRNAs, it will be necessary to determine the expression patterns, localization and functions of different family members, as well as to elucidate if different family members show differential mobility. Some work in this direction has already been started in several laboratories (e.g. [32,34,48]).

The mechanisms, as well as the regulators, of intercellular and interorgan signaling by miRNAs remain largely unknown. Taking together all the information presented here, we propose that miRNAs can passively diffuse through plasmodesmata, but movement can be restricted between certain cell types, at certain developmental stages or in response to external signals by retention mechanisms, e.g. by binding to proteins or other cellular components. Nevertheless, other pathways for translocation might also exist.

Macromolecules can be transmitted between different organisms. Examples of this are the delivery of bacterial and fungal effector proteins to plants [136,137] and the translocation of RNAs, proteins and RNA silencing signals from host plants to parasitic weeds [138]. Testing whether miRNAs can also move between species could open a new area of research. The rapid progress in the field of small RNA investigation in recent years promises novel and significant discoveries in the near future.

## Acknowledgments

We thank the anonymous reviewers for their constructive comments, which have helped to improve this review. E. M.-G. was a recipient of an FPI Ph.D. fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation. This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant CSD2007-00036) and the Department of Innovation, Universities and Enterprise of Catalonia (2009-SGR-703 and Catalan Biotechnology Reference Network).

## References

- [1] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75 (1993) 843–854.
- [2] B. Wightman, I. Ha, G. Ruvkun, Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*, *Cell* 75 (1993) 855–862.
- [3] M. Axtell, J. Westholm, E. Lai, *Vive la différence*: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals, *Genome Biology* 12 (2011) 221.
- [4] E.J. Chapman, J.C. Carrington, Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways, *Nature Reviews Genetics* 8 (2007) 884–896.
- [5] C.W. Melnyk, A. Molnar, D.C. Baulcombe, Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals, *EMBO Journal* 30 (2011) 3553–3563.
- [6] O. Voinnet, Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs, *Cell* 136 (2009) 669–687.
- [7] D.H. Chitwood, M.C. Timmermans, Small RNAs are on the move, *Nature* 467 (2010) 415–419.
- [8] G. Chuck, H. Candela, S. Hake, Big impacts by small RNAs in plant development, *Current Opinion in Plant Biology* 12 (2009) 81–86.
- [9] R. Sunkar, Y.-F. Li, G. Jagadeeswaran, Functions of microRNAs in plant stress responses, *Trends in Plant Science* 17 (2012) 196–203.
- [10] C.A. Brosnan, O. Voinnet, Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications, *Current Opinion in Plant Biology* 14 (2011) 580–587.
- [11] S. Katiyar-Agarwal, S. Gao, A. Vivian-Smith, H. Jin, A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*, *Genes & Development* 21 (2007) 3123–3134.
- [12] S. Mi, et al., Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide, *Cell* 133 (2008) 116–127.
- [13] T.A. Montgomery, et al., Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in *TAS3* trans-acting siRNA formation, *Cell* 133 (2008) 128–141.



- [14] L. Wu, et al., DNA methylation mediated by a microRNA pathway, *Molecular Cell* 38 (2010) 465–475.
- [15] X. Yang, H. Zhang, L. Li, Alternative mRNA processing increases the complexity of microRNA-based gene regulation in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 70 (2012) 421–431.
- [16] G. Obernosterer, P.J. Leuschner, M. Alenius, J. Martinez, Post-transcriptional regulation of microRNA expression, *RNA* 12 (2006) 1161–1177.
- [17] G. Wu, M.Y. Park, S.R. Conway, J.-W. Wang, D. Weigel, R.S. Poethig, The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*, *Cell* 138 (2009) 750–759.
- [18] N.R. Gursansky, I.R. Searle, B.J. Carroll, Mobile microRNAs hit the target, *Traffic* 12 (2011) 1475–1482.
- [19] S. Dinant, P. Suárez-López, Multitude of long-distance signal molecules via phloem, in: G. Witzany, F. Baluška (Eds.), *Biocommunication of Plants*, Springer, Heidelberg, 2012, pp. 89–121.
- [20] M.A. Domagalska, O. Leyser, Signal integration in the control of shoot branching, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (2011) 211–221.
- [21] S.J. Lehesranta, R. Lichtenberger, Y. Helariutta, Cell-to-cell communication in vascular morphogenesis, *Current Opinion in Plant Biology* 13 (2010) 59–65.
- [22] T.J. Lough, W.J. Lucas, Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking, *Annual Review of Plant Biology* 57 (2006) 203–232.
- [23] J.M. Van Norman, N.W. Breakfield, P.N. Benfey, Intercellular communication during plant development, *Plant Cell* 23 (2011) 855–864.
- [24] F.F. de Felippes, F. Ott, D. Weigel, Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in *Arabidopsis thaliana*, *Nucleic Acids Research* 39 (2011) 2880–2889.
- [25] M.T. Juárez, J.S. Kui, J. Thomas, B.A. Heller, M.C.P. Timmermans, microRNA-mediated repression of *rolled leaf1* specifies maize leaf polarity, *Nature* 428 (2004) 84–88.
- [26] C.A. Kidner, R.A. Martienssen, Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1, *Nature* 428 (2004) 81–84.
- [27] R. Schwab, S. Ossowski, M. Rießer, N. Warthmann, D. Weigel, Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 18 (2006) 1121–1133.
- [28] J.P. Alvarez, I. Pekker, A. Goldshmidt, E. Blum, Z. Amsellem, Y. Eshed, Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species, *Plant Cell* 18 (2006) 1134–1151.
- [29] E.A. Parizotto, P. Dunoyer, N. Rahm, C. Himber, O. Voinnet, In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA, *Genes & Development* 18 (2004) 2237–2242.
- [30] E.M. Tretter, J.P. Alvarez, Y. Eshed, J.L. Bowman, Activity range of *Arabidopsis* small RNAs derived from different biogenesis pathways, *Plant Physiology* 147 (2008) 58–62.
- [31] R. Schwab, et al., Endogenous tasiRNAs mediate non-cell autonomous effects on gene regulation in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS ONE* 4 (2009) e5980.
- [32] A. Carlsbecker, et al., Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate, *Nature* 465 (2010) 316–321.
- [33] D.H. Chitwood, F.T. Nogueira, M.D. Howell, T.A. Montgomery, J.C. Carrington, M.C. Timmermans, Pattern formation via small RNA mobility, *Genes & Development* 23 (2009) 549–554.
- [34] S.-I. Lin, et al., Regulatory network of microRNA399 and *PHO2* by systemic signaling, *Plant Physiology* 147 (2008) 732–746.
- [35] E. Marín, et al., miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and their *AUXIN RESPONSE FACTOR* targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth, *Plant Cell* 22 (2010) 1104–1117.
- [36] S. Miyashima, S. Koi, T. Hashimoto, K. Nakajima, Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root, *Development* 138 (2011) 2303–2313.
- [37] F.T.S. Nogueira, et al., Regulation of small RNA accumulation in the maize shoot apex, *PLoS Genetics* 5 (2009) e1000320.
- [38] B.D. Pant, A. Buhtz, J. Kehr, W.-R. Scheible, MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis, *Plant Journal* 53 (2008) 731–738.
- [39] A. Vatén, et al., Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development, *Developmental Cell* 21 (2011) 1144–1155.
- [40] T.M. Burch-Smith, P.C. Zambryski, Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within, *Annual Review of Plant Biology* 63 (2012) 239–260.
- [41] S. Ueki, V. Citovsky, To gate, or not to gate: regulatory mechanisms for intercellular protein transport and virus movement in plants, *Molecular Plant* 4 (2011) 782–793.
- [42] T.K. Hyun, M.N. Uddin, Y. Rim, J.Y. Kim, Cell-to-cell trafficking of RNA and RNA silencing through plasmodesmata, *Protoplasma* 248 (2011) 101–116.
- [43] N. Fahlgren, et al., Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*, *Current Biology* 16 (2006) 939–944.
- [44] D. García, S.A. Collier, M.E. Byrne, R.A. Martienssen, Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the *trans*-acting siRNA pathway, *Current Biology* 16 (2006) 933–938.
- [45] C. Hunter, M.R. Willmann, G. Wu, M. Yoshikawa, M. de la Luz Gutiérrez-Nava, S.R. Poethig, *Trans*-acting siRNA-mediated repression of *ETTIN* and *ARF4* regulates heteroblasty in *Arabidopsis*, *Development* 133 (2006) 2973–2981.
- [46] C. Hunter, H. Sun, R.S. Poethig, The *Arabidopsis* heterochronic gene *ZIPPY* is an ARGONAUTE family member, *Current Biology* 13 (2003) 1734–1739.
- [47] L. Xu, et al., Genetic interaction between the *AS1-AS2* and *RDR6-SGS3-AGO7* pathways for leaf morphogenesis, *Plant and Cell Physiology* 47 (2006) 853–863.
- [48] F.T. Nogueira, S. Madi, D.H. Chitwood, M.T. Juárez, M.C. Timmermans, Two small regulatory RNAs establish opposing fates of a developmental axis, *Genes & Development* 21 (2007) 750–755.
- [49] M.C.P. Timmermans, N.P. Schultes, J.P. Jankovsky, T. Nelson, *Leafbladeless1* is required for dorsoventrality of lateral organs in maize, *Development* 125 (1998) 2813–2823.
- [50] J.G. Dubrovsky, et al., Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105 (2008) 8790–8794.
- [51] E.K. Yoon, J.H. Yang, J. Lim, S.H. Kim, S.-K. Kim, W.S. Lee, Auxin regulation of the *microRNA390*-dependent transacting small interfering RNA pathway in *Arabidopsis* lateral root development, *Nucleic Acids Research* 38 (2010) 1382–1391.
- [52] M.E. Byrne, Shoot meristem function and leaf polarity: the role of class III HD-ZIP genes, *PLoS Genetics* 2 (2006) e89.
- [53] J.-H. Jung, C.-M. Park, *MIR166/165* genes exhibit dynamic expression patterns in regulating shoot apical meristem and floral development in *Arabidopsis*, *Planta* 225 (2007) 1327–1338.
- [54] T.M. Foster, et al., A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex, *Plant Cell* 14 (2002) 1497–1508.
- [55] E. Levine, P. McHale, H. Levine, Small regulatory RNAs may sharpen spatial expression patterns, *PLoS Computational Biology* 3 (2007) e233.
- [56] J. Kehr, A. Buhtz, Long distance transport and movement of RNA through the phloem, *Journal of Experimental Botany* 59 (2008) 85–92.
- [57] T.-Y. Liu, C.-Y. Chang, T.-J. Chiou, The long-distance signaling of mineral macronutrients, *Current Opinion in Plant Biology* 12 (2009) 312–319.
- [58] J. Shah, Plants under attack: systemic signals in defence, *Current Opinion in Plant Biology* 12 (2009) 459–464.
- [59] C. Turnbull, Long-distance regulation of flowering time, *Journal of Experimental Botany* 62 (2011) 4399–4413.
- [60] A. Buhtz, J. Pieritz, F. Springer, J. Kehr, Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility, *BMC Plant Biology* 10 (2010) 64.
- [61] G. Chuck, D. O'Connor, Small RNAs going the distance during plant development, *Current Opinion in Plant Biology* 13 (2010) 40–45.
- [62] B.-C. Yoo, et al., A systemic small RNA signaling system in plants, *Plant Cell* 16 (2004) 1979–2000.
- [63] A. Buhtz, F. Springer, L. Chappell, D.C. Baulcombe, J. Kehr, Identification and characterization of small RNAs from the phloem of *Brassica napus*, *Plant Journal* 53 (2008) 739–749.
- [64] C. Rodríguez-Medina, C.A. Atkins, A.J. Mann, M.E. Jordan, P.M. Smith, Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.), *BMC Plant Biology* 11 (2011) 36.
- [65] F. Gaupels, T. Knauer, A.J.E. van Bel, A combinatorial approach for analysis of protein sets in barley sieve-tube samples using EDTA-facilitated exudation and aphid stylectomy, *Journal of Plant Physiology* 165 (2008) 95–103.
- [66] S. Dinant, J.-L. Bonnemain, C. Girousse, J. Kehr, Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding, *Comptes Rendus Biologies* 333 (2010) 504–515.
- [67] T. Sasaki, M. Chino, H. Hayashi, T. Fujiwara, Detection of several mRNA species in rice phloem sap, *Plant and Cell Physiology* 39 (1998) 895–897.
- [68] C. Doering-Saad, H.J. Newbury, J.S. Bale, J. Pritchard, Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements, *Journal of Experimental Botany* 53 (2002) 631–637.
- [69] F. Gaupels, et al., Adaptation of aphid stylectomy for analyses of proteins and mRNAs in barley phloem sap, *Journal of Experimental Botany* 59 (2008) 3297–3306.
- [70] E. Varkonyi-Gasic, N. Gould, M. Sandanayaka, P. Sutherland, R. MacDiarmid, Characterisation of microRNAs from apple (*Malus domestica* 'Royal Gala') vascular tissue and phloem sap, *BMC Plant Biology* 10 (2010) 159.
- [71] C. Zhang, X. Yu, B.G. Ayre, R. Turgeon, The origin and composition of cucurbit phloem exudate, *Plant Physiology* 158 (2012) 1873–1882.
- [72] M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, B. Bartel, MicroRNAs and their regulatory roles in plants, *Annual Review of Plant Biology* 57 (2006) 19–53.
- [73] K. Aung, S.-I. Lin, C.-C. Wu, Y.-T. Huang, C.-I. Su, T.-J. Chiou, *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene, *Plant Physiology* 141 (2006) 1000–1011.
- [74] A. Válczi, E. Várallyay, S. Kauppinen, J. Burgyán, Z. Havelda, Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues, *Plant Journal* 47 (2006) 140–151.
- [75] T.-J. Chiou, S.-I. Lin, Signaling network in sensing phosphate availability in plants, *Annual Review of Plant Biology* 62 (2011) 185–206.
- [76] H. Fujii, T.J. Chiou, S.I. Lin, K. Aung, J.K. Zhu, A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*, *Current Biology* 15 (2005) 2038–2043.
- [77] R. Bari, B. Datt Pant, M. Stitt, W.R. Scheible, *PHO2*, microRNA399, and *PHR1* define a phosphate-signaling pathway in plants, *Plant Physiology* 141 (2006) 988–999.
- [78] X. Chen, J. Liu, Y. Cheng, D. Jia, *HEN1* functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower, *Development* 129 (2002) 1085–1094.

- [79] W. Park, J. Li, R. Song, J. Messing, X. Chen, CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *Current Biology* 12 (2002) 1484–1495.
- [80] M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA, *Molecular Cell* 14 (2004) 787–799.
- [81] C.G. Kawashima, et al., Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types, *Plant Journal* 57 (2009) 313–321.
- [82] E. Allen, Z. Xie, A.M. Gustafson, J.C. Carrington, microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants, *Cell* 121 (2005) 207–221.
- [83] R. Sunkar, A. Kapoor, J.-K. Zhu, Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance, *Plant Cell* 18 (2006) 2051–2065.
- [84] H. Yamasaki, S.E. Abdel-Ghany, C.M. Cohu, Y. Kobayashi, T. Shikanai, M. Pilon, Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*, *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 16369–16378.
- [85] H. Yamasaki, M. Hayashi, M. Fukazawa, Y. Kobayashi, T. Shikanai, SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 21 (2009) 347–361.
- [86] M. Lundmark, C.J. Körner, T.H. Nielsen, Global analysis of microRNA in *Arabidopsis* in response to phosphate starvation as studied by locked nucleic acid-based microarrays, *Physiologia Plantarum* 140 (2010) 57–68.
- [87] P. Achard, A. Herr, D.C. Baulcombe, N.P. Harberd, Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA, *Development* 131 (2004) 3357–3365.
- [88] R.S. Poethig, Small RNAs and developmental timing in plants, *Current Opinion in Genetics & Development* 19 (2009) 374–378.
- [89] Q.-H. Zhu, C.A. Helliwell, Regulation of flowering time and floral patterning by miR172, *Journal of Experimental Botany* 62 (2011) 487–495.
- [90] M. Zhao, H. Ding, J.-K. Zhu, F. Zhang, W.-X. Li, Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*, *New Phytologist* 190 (2011) 906–915.
- [91] J.P. Combier, et al., MtHAP 2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*, *Genes & Development* 20 (2006) 3084–3088.
- [92] M.K. Chailakhyan, L.I. Yanina, A.G. Devedzhyan, G.N. Lotova, Photoperiodism and tuber formation in grafting of tobacco onto potato, *Doklady Akademii Nauk* 257 (1981) 1276–1280.
- [93] C. Navarro, et al., Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T, *Nature* 478 (2011) 119–122.
- [94] J.A. Abelenda, C. Navarro, S. Prat, From the model to the crop: genes controlling tuber formation in potato, *Current Opinion in Biotechnology* 22 (2011) 287–292.
- [95] R.W. King, L.T. Evans, Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the florigen black box, *Annual Review of Plant Biology* 54 (2003) 307–328.
- [96] R.W. King, et al., Regulation of flowering in the long-day grass *Lolium temulentum* by gibberellins and the FLOWERING LOCUS T gene, *Plant Physiology* 141 (2006) 498–507.
- [97] R. Komiya, S. Yokoi, K. Shimamoto, A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice, *Development* 136 (2009) 3443–3450.
- [98] F. Turck, F. Fornara, G. Coupland, Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage, *Annual Review of Plant Biology* 59 (2008) 573–594.
- [99] A. Martin, H. Adam, M. Díaz-Mendoza, M. Żurczak, N.D. González-Schain, P. Suárez-López, Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA *miR172*, *Development* 136 (2009) 2873–2881.
- [100] A. Kasai, A. Kanehira, T. Harada, *miR172* can move long distances in *Nicotiana benthamiana*, *Open Plant Science Journal* 4 (2010) 1–6.
- [101] J.-H. Jung, et al., The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 19 (2007) 2736–2748.
- [102] M. Endo, S. Nakamura, T. Araki, N. Mochizuki, A. Nagatani, Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing *FLOWERING LOCUS T* expression in *Arabidopsis* vascular bundles, *Plant Cell* 17 (2005) 1941–1952.
- [103] J.-W. Wang, R. Schwab, B. Czech, E. Mica, D. Weigel, Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell* 20 (2008) 1231–1243.
- [104] M.M. Alonso-Peral, et al., The microRNA159-regulated *GAMYB-like* genes inhibit growth and promote programmed cell death in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 154 (2010) 757–771.
- [105] W. Kim, H. Ahn, T.-J. Chiou, J. Ahn, The role of the miR399-*PHO2* module in the regulation of flowering time in response to different ambient temperatures in *Arabidopsis thaliana*, *Molecules and Cells* 32 (2011) 83–88.
- [106] H. Vaucheret, F. Vazquez, P. Crete, D.P. Bartel, The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development, *Genes & Development* 18 (2004) 1187–1197.
- [107] Z. Xie, K.D. Kasschau, J.C. Carrington, Negative feedback regulation of *Dicer-Like1* in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation, *Current Biology* 13 (2003) 784–789.
- [108] P. Dunoyer, et al., An endogenous, systemic RNAi pathway in plants, *EMBO Journal* 29 (2010) 1699–1712.
- [109] A. Molnar, C.W. Melnyk, A. Bassett, T.J. Hardcastle, R. Dunn, D.C. Baulcombe, Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells, *Science* 328 (2010) 872–875.
- [110] P. Dunoyer, et al., Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells, *Science* 328 (2010) 912–916.
- [111] H. Zhu, et al., *Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development, *Cell* 145 (2011) 242–256.
- [112] A.J. Maule, Plasmodesmata: structure, function and biogenesis, *Current Opinion in Plant Biology* 11 (2008) 680–686.
- [113] C. Himber, P. Dunoyer, G. Moissiard, C. Ritzenthaler, O. Voinnet, Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing, *EMBO Journal* 22 (2003) 4523–4533.
- [114] J.-H. Jung, P.J. Seo, J.H. Ahn, C.-M. Park, *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering, *Journal of Biological Chemistry* 287 (2012) 16007–16016.
- [115] Q. Liu, X. Yao, L. Pi, H. Wang, X. Cui, H. Huang, The *ARGONAUTE10* gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 58 (2009) 27–40.
- [116] P. Brodersen, et al., Isoprenoid biosynthesis is required for miRNA function and affects membrane association of ARGONAUTE 1 in *Arabidopsis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109 (2012) 1778–1783.
- [117] J.M. Franco-Zorrilla, et al., Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity, *Nature Genetics* 39 (2007) 1033–1037.
- [118] M.A. Cortez, C. Bueso-Ramos, J. Ferdin, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, G.A. Calin, MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers, *Nature Reviews Clinical Oncology* 8 (2011) 467–477.
- [119] J.D. Arroyo, et al., Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108 (2011) 5003–5008.
- [120] M.P. Hunter, et al., Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles, *PLoS ONE* 3 (2008) e3694.
- [121] E. Hergenreider, et al., Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs, *Nature Cell Biology* 14 (2012) 249–256.
- [122] M. Krieger, Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems, *Journal of Clinical Investigation* 108 (2001) 793–797.
- [123] K.C. Vickers, B.T. Palmisano, B.M. Shoucri, R.D. Shamburek, A.T. Remaley, MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, *Nature Cell Biology* 13 (2011) 423–433.
- [124] E.D. Brenner, R. Stahlberg, S. Mancuso, J. Vivanco, F. Baluška, E. Van Volkenburgh, Plant neurobiology: an integrated view of plant signaling, *Trends in Plant Science* 11 (2006) 413–419.
- [125] D. Gibbins, O. Voinnet, Control of RNA silencing and localization by endolysosomes, *Trends in Cell Biology* 20 (2010) 491–501.
- [126] V. Jouannet, A.B. Moreno, T. Elmayer, H. Vaucheret, M.D. Crespi, A. Maizel, Cytoplasmic *Arabidopsis* AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis, *EMBO Journal* 31 (2012) 1704–1713.
- [127] L.C. Hsieh, et al., Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing, *Plant Physiology* 151 (2009) 2120–2132.
- [128] K.J. Oparka, R. Turgeon, Sieve elements and companion cells—Traffic control centers of the phloem, *Plant Cell* 11 (1999) 739–750.
- [129] D. Jackson, Opening up the communication channels: recent insights into plasmodesmal function, *Current Opinion in Plant Biology* 3 (2000) 394–399.
- [130] E.J. Chapman, A.I. Prokhnovsky, K. Gopinath, V.V. Dolja, J.C. Carrington, Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step, *Genes & Development* 18 (2004) 1179–1186.
- [131] B. Yu, E.J. Chapman, Z. Yang, J.C. Carrington, X. Chen, Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*, *FEBS Letters* 580 (2006) 3117–3120.
- [132] N. Baumberger, C.-H. Tsai, M. Lie, E. Havecker, D.C. Baulcombe, The polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation, *Current Biology* 17 (2007) 1609–1614.
- [133] C. Meng, J. Chen, S.-w. Ding, J. Peng, S.-M. Wong, Hibiscus chlorotic ringspot virus coat protein inhibits *trans*-acting small interfering RNA biogenesis in *Arabidopsis*, *Journal of General Virology* 89 (2008) 2349–2358.
- [134] T. Csorba, R. Lózsá, G. Hutvagner, J. Burguán, Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1, *Plant Journal* 62 (2010) 463–472.
- [135] A. Giner, L. Lakatos, M. García-Chapa, J.J. López-Moya, J. Burguán, Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs, *PLoS Pathogens* 6 (2010) e1000996.
- [136] R. de Jonge, M.D. Bolton, B.P.H.J. Thomma, How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors, *Current Opinion in Plant Biology* 14 (2011) 400–406.
- [137] D.R. Hann, S. Gimenez-Ibanez, J.P. Rathjen, Bacterial virulence effectors and their activities, *Current Opinion in Plant Biology* 13 (2010) 388–393.
- [138] J.H. Westwood, J.K. Roney, P.A. Khatibi, V.K. Stromberg, RNA translocation between parasitic plants and their hosts, *Pest Management Science* 65 (2009) 533–539.