



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mecanismos de control del crecimiento de
Arabidopsis thaliana por la temperatura**

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Luciana Bianchimano

Director de tesis: Dr. Jorge José Casal

Director Adjunto: Dr. Carlos Esteban Hernando

Consejero de estudios: Dr. Pablo Diego Cerdán

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas. Fundación Instituto
Leloir. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires

Fecha de defensa: 18 de julio de 2025.

Índice

Índice	2
Resumen	4
Abstract.....	5
Agradecimientos.....	6
Introducción	7
La percepción de la temperatura y vía de señalización	9
Los PIFs regulan el crecimiento a través de las auxinas	11
Mecanismos de acción de los termosensores	13
Separación de fases líquido-líquido.....	16
Inhibición del crecimiento por temperaturas muy altas.....	21
Objetivos.....	23
Materiales y métodos	25
Resultados	36
Capítulo_1	
Meta-análisis del transcriptoma de <i>Arabidopsis thaliana</i> en respuesta a la temperatura.....	37
Impacto de la temperatura en el transcriptoma.....	38
Caracterización de la expresión de los genes vinculados a la acción de la auxina en respuesta a la temperatura	41
Capítulo_2	
Las temperaturas muy altas revierten la promoción de la vía de auxinas estimulada por temperaturas cálidas.....	46
Capítulo_3	
El módulo phyB-PIF4 regula la inhibición del crecimiento en temperaturas muy altas.....	54

Capítulo_4

Las temperaturas muy altas estabilizan a los condensados aún si en ellos predomina Pr.....	73
--	----

Capítulo_5

La supervivencia de las plantas en temperaturas muy altas requiere de ELF3	84
La dinámica nuclear de ELF3 no explica la inhibición del crecimiento en temperaturas muy altas	85
ELF3 se localiza en el citoplasma en temperaturas muy altas y es un componente que otorga termorresistencia.....	90
Discusión	94
Conclusiones.....	107
Bibliografía	110
Anexo	126

Mecanismos de control del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* por la temperatura

Resumen

Para enfrentar las frecuentes variaciones de temperatura a que están expuestas, las plantas utilizan termorreceptores sensoriales que transfieren la información al transcriptoma y proteoma, ajustando el crecimiento y desarrollo para minimizar efectos adversos. Los mecanismos que regulan el crecimiento en respuesta a la temperatura aún no son completamente comprendidos. En esta tesis, mediante el meta-análisis de datos transcriptómicos disponibles públicamente correspondientes a plantas expuestas a un amplio rango de temperaturas, se observó que genes de la vía de las auxinas reducen su expresión en condiciones de calor extremo que son inhibitorias del crecimiento. Experimentos posteriores, confirmaron que efectivamente los niveles de auxina y la señalización por la vía de esta hormona caen a altas temperaturas en plantas de *Arabidopsis thaliana*, acompañando la caída del crecimiento del hipocotilo. Las temperaturas muy altas aumentaron la abundancia del termosensor phyB, el tamaño de los condensados nucleares formados por phyB, tanto en plantas como en células de mamíferos y el impacto inhibitorio de phyB sobre el crecimiento del hipocotilo. El factor de transcripción PIF4, que es necesario para la síntesis de auxina y es controlado negativamente por phyB, disminuyó su abundancia en los cotiledones. Por otro lado, el termosensor ELF3 formó gránulos de estrés citoplasmáticos en respuesta a temperaturas muy altas, posiblemente modulando la respuesta óxido-reducción para reducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno y favorecer la supervivencia de las plantas en estas condiciones. La represión del crecimiento por la vía phyB-PIF4-auxina y la formación de gránulos citoplasmáticos de ELF3 a altas temperaturas emergen como importantes mecanismos de las plantas para enfrentar el desafío impuesto por el calentamiento global.

Mechanisms of growth control in *Arabidopsis thaliana* by temperature

Abstract

To cope with the frequent temperature variations they are exposed to, plants use sensory thermoreceptors that transfer information to the transcriptome and proteome, adjusting growth and development to minimize adverse effects. The mechanisms that regulate growth in response to temperature are not yet fully understood. In this thesis, through the meta-analysis of publicly available transcriptomic data from plants exposed to a wide range of temperatures, it was observed that genes in the auxin pathway reduce their expression under extreme heat conditions that inhibit growth. Subsequent experiments confirmed that auxin levels and signaling through this hormone pathway decrease at high temperatures in *Arabidopsis thaliana* plants, accompanying the decline in hypocotyl growth. Very high temperatures increased the abundance of the thermosensor phyB, the size of nuclear condensates formed by phyB, both in plants and mammalian cells, and the inhibitory impact of phyB on hypocotyl growth. The transcription factor PIF4, which is required for auxin synthesis and negatively regulated by phyB, decreased its abundance in the cotyledons. On the other hand, the thermosensor ELF3 formed cytoplasmic stress granules in response to high temperatures, possibly modulating the redox response to reduce reactive oxygen species accumulation and promote plant survival under these conditions. The repression of growth through the phyB-PIF4-auxin pathway and the formation of cytoplasmic ELF3 granules under high temperatures emerge as important mechanisms for plants to face the challenge imposed by global warming.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Jorge, mi director, por su guía constante, paciencia, motivación y optimismo. Tu forma de acompañarme fue (y sigue siendo) muy importante para desarrollar mi camino con confianza y entusiasmo y lo agradezco profundamente.

A Esteban, mi director asistente, por el apoyo, las ideas raras y por contagiarme el entusiasmo. Gracias por brindarme ayuda siempre que la necesite.

Al Dr. Matías Zurbriggen por recibirme en su laboratorio en Alemania con mucha amabilidad.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio de FIL y de IFEVA, les agradezco por la colaboración diaria, el intercambio de ideas y la ayuda siempre que la necesite. Aprendí mucho de ustedes.

A mi mamá Gabriela, mi papá Hernán y mis hermanas Mariana y Cecilia, por su amor, por estar siempre presentes y por darme la libertad para estudiar lo que me gusta. Gracias por ser mi pilar.

A mi abuela Mana, por transmitirme la curiosidad y el respeto de la naturaleza.

A mis amigas, Lucila y Diana. Gracias por las risas y el indescriptible cariño que me hacen sentir. A Ezequiel, Pablo, Manuel, por la larga amistad que prevalece. A Rodrigo, Iván, Nicolás y Vanesa, por compartir conmigo años de estudio y todo lo demás después.

Y a Daniel, por todo su amor.

Introducción

Introducción

Las plantas están expuestas a variaciones de temperatura tanto diarias como estacionales, además de cambios a largo plazo derivados del cambio climático. Estas fluctuaciones son percibidas para generar aclimatación y adaptabilidad, que permite a las plantas ajustar sus funciones a los desafíos que imponen las distintas temperaturas. Por ejemplo, temperaturas extremadamente frías pueden enlentecer el metabolismo y el transporte de nutrientes afectando el desarrollo general de la planta y su capacidad para competir por recursos, además de afectar la actividad del microbioma del suelo, disminuyendo la disponibilidad de minerales que se absorben por las raíces. Esto ralentiza el crecimiento y perjudica la formación de flores y semillas, afectando la reproducción y el rendimiento general de la planta. Por otro lado, temperaturas extremadamente altas ($> 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el caso de plantas de *Arabidopsis thaliana*) pueden desestabilizar las membranas celulares, desnaturalizar proteínas y generar la acumulación de especies reactivas de oxígeno, comprometiendo la viabilidad celular. Además, pueden acelerar el ciclo de vida de la planta, promoviendo una germinación y crecimiento más rápidos, pero a costa de una menor inversión en el desarrollo reproductivo, lo que reduce la producción de semillas y frutos. Pero incluso sin alcanzar valores extremos, las temperaturas altas no estresantes ($< 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) también pueden generar efectos negativos, como el aumento en la transpiración, la respiración y la fotorrespiración, lo que conlleva una mayor pérdida de agua y carbohidratos, reduciendo la energía disponible para el crecimiento y la reproducción. En todos los casos, los cambios en la temperatura influyen en la fisiología vegetal y pueden comprometer su rendimiento y supervivencia.

El entendimiento de cómo las plantas responden a los cambios en la temperatura es crucial para comprender las adaptaciones de las plantas a cambios ambientales y mejorar la resistencia de cultivos importantes en un futuro climático incierto. Diversos estudios, incluidos los realizados en nuestro laboratorio, han investigado los mecanismos mediante los cuales las temperaturas cálidas favorecen el crecimiento en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los procesos que conducen a la inhibición del crecimiento en temperaturas más elevadas. En esta tesis estudiamos el crecimiento de *Arabidopsis* en respuesta a temperaturas frías, templadas, cálidas y muy altas con particular énfasis en la regulación del crecimiento por temperaturas muy altas.

La percepción de la temperatura y vía de señalización

Las plantas pueden percibir la temperatura a través de los termosensores, que decodifican directamente el estímulo en señalización celular. Hasta ahora se conocen cuatro sensores de temperatura: phytochrome B (phyB) (Legris *et al.*, 2016, Jung *et al.*, 2016), EARLY FLOWERING 3 (ELF3) (Jung *et al.*, 2020), PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 (PIF7) (Chung *et al.*, 2020) y RESPUESTA TERMO-CON ABA 1 (TWA1) (Bohn *et al.*, 2024). phyB, ELF3 y PIF7 actúan en la misma vía de señalización y regulan el crecimiento a través de los PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs), importantes factores de transcripción de tipo hélice-bucle-hélice básico (bHLH) que regulan la expresión de genes de crecimiento (**Figura 1**).

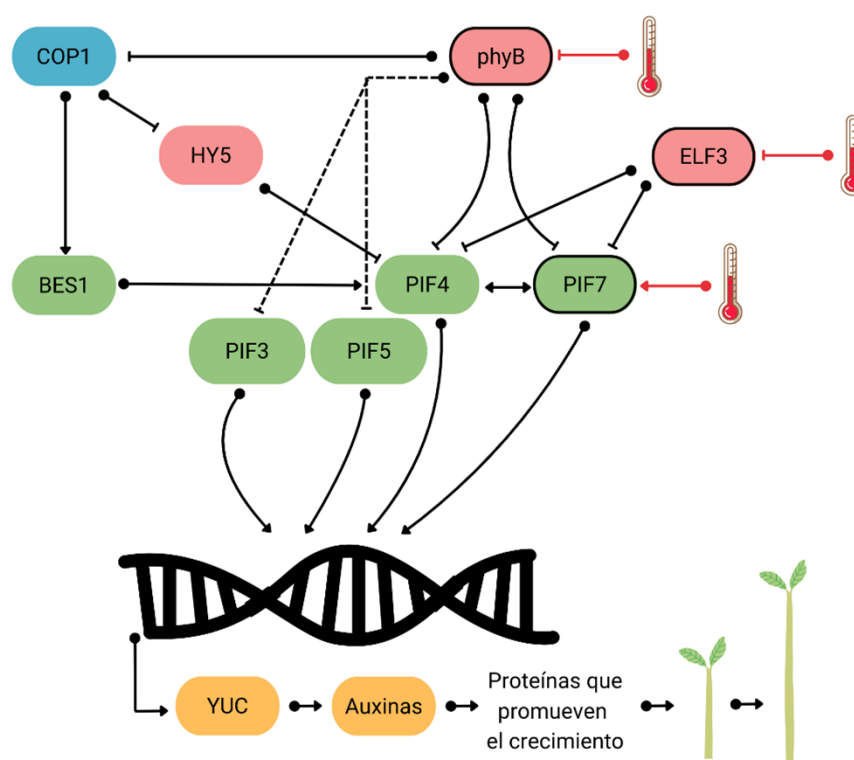


Figura 1. La temperatura controla el alargamiento del hipocotilo a través de múltiples componentes. Tres termosensores (phyB, ELF3, PIF7) controlan la actividad de factores de transcripción para regular la elongación del hipocotilo. Los termómetros indican el impacto de temperaturas cálidas (28 °C) en los termosensores, señalados con borde negro. Las cajas verdes representan factores de transcripción que promueven el crecimiento, las cajas naranjas genes relacionados a las auxinas, las cajas rojas genes que inhiben el crecimiento y la caja azul a una E3 ligasa. Los vínculos entre los genes se señalan con flechas (promoción), flecha partida (inhibición) y rayas (vínculos hipotéticos). Adaptado de Casal *et al.*, 2024.

En temperaturas cálidas, el aumento de la actividad de los PIFs genera un conjunto de cambios fisiológicos conocidos como termomorfogénesis, que incluye el crecimiento del hipocotilo, peciolo y de la raíz principal, el aumento en el número de

estomas, la elevación de cotiledones y hojas (hiponastia), y la aceleración de la floración (Casal & Balasubramanian., 2019). Estos cambios también se observan en plantas expuestas a sombra, con lo cual la convergencia en los mecanismos genéticos provoca el mismo impacto fisiológico (Casal & Balasubramanian., 2019, Romero-Montepaone *et al.*, 2021).

En temperaturas templadas, phyB interactúa directamente con PIF4 y como resultado PIF4 es fosforilado, ubiquitinizado y degradado en el proteasoma, aunque también puede ser agrupado en condensados nucleares (Park *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2022). phyB también controla la degradación de PIF3 (Bauer *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004), de PIF5 (Shen *et al.*, 2007; Lorrain *et al.*, 2008) y de PIF7, que no es degradado pero su actividad disminuye (Leivar *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012, Xie *et al.*, 2023). Las temperaturas cálidas inactivan a phyB, aliviando la represión sobre PIF4 y presumiblemente sobre los otros PIFs, lo que promueve el crecimiento (Casal *et al.*, 2024). En el caso de PIF3, PIF5 y PIF7 la bibliografía mencionada refiere a comprobaciones en sombra, pero dada la convergencia entre las vías de sombra y temperaturas cálidas (Casal & Balasubramanian., 2019, Romero-Montepaone *et al.*, 2021), en la literatura se plantea la hipótesis que phyB también regula la degradación de PIF7 en temperaturas cálidas (Casal *et al.*, 2024), y en esta tesis lo extendemos a PIF3 y PIF5. Por otra parte, ELF3 forma parte de un complejo transcripcional que reprime directamente la expresión de los genes *PIF4* y *PIF5* (Nusinow *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2020) e inhibe las proteínas PIF4 (Box *et al.*, 2015, Nieto *et al.*, 2015) y PIF7 (Jiang *et al.*, 2019), impidiendo que promuevan la transcripción de genes de crecimiento. Además, phyB aumenta la estabilidad de ELF3 (Nieto *et al.*, 2015) y, en conjunto, reducen la capacidad de los PIFs de unirse a los promotores de los genes que promueven el crecimiento. Las temperaturas cálidas también regulan negativamente la actividad de ELF3, liberando la inhibición que ejerce sobre los PIF4 (Murcia *et al.*, 2022, Nieto *et al.*, 2015) y presumiblemente también la de PIF7, aunque esto está únicamente comprobado en sombra (Jiang *et al.*, 2019). Por otro lado, las temperaturas cálidas aumentan la actividad de PIF7 (Chung *et al.*, 2020), que puede formar heterodímeros con PIF3 (Leivar *et al.*, 2020) y con PIF4 (Kidokoro *et al.*, 2009, Chung *et al.*, 2020, Fiorucci *et al.*, 2020) y esta interacción favorece la unión a genes comunes.

PIF4 y PIF7 son los promotores principales el crecimiento (Delker *et al.*, 2022) mientras que PIF3 y PIF5 actúan como moduladores positivos adicionales (Koini *et al.*, 2009, Stavang *et al.*, 2009, Romero-Montepaone *et al.*, 2021). En la vía de señalización también participan BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1), un factor de transcripción activado por los brasinoesteroides, una hormona vegetal importante en termomorfogénesis, que en el hipocotilo favorece la expresión de PIF4 (Costigliolo Rojas *et al.*, 2022), y el factor de transcripción ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) que inhibe a PIF4 (Lee *et al.*, 2021). En temperaturas cálidas también se acumula en el núcleo CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) (Park *et al.*, 2017), una E3 ligasa involucrada en la ubiquitinación y degradación en el proteosoma, que controla la degradación de HY5 (Lau & Deng, 2012) y BES1 (Costigliolo Rojas *et al.*, 2022).

Los PIFs regulan el crecimiento a través de las auxinas

En temperaturas cálidas (27 - 28 °C en el caso de *Arabidopsis thaliana*), cuando no se encuentran inhibidos por los termosensores o por los otros componentes de la vía, PIF4, PIF5 y PIF7 se unen a los sitios promotores de los genes de síntesis y señalización de auxinas, como *IAA19*, *YUC8* y *TAA1* (Franklin *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2012, Leivar & Quail, 2011, Nozue *et al.*, 2011, Fiorucci *et al.*, 2020, Chung *et al.*, 2020). Sobre PIF3 no hay experimentos que confirmen la unión a genes de la vía de auxinas, pero puede formar homodímeros y heterodímeros con PIF4 y PIF7 (Leivar *et al.*, 2020); ambos (homodímero y heterodímero) reconocen secuencias G-box comúnmente presentes en genes de auxinas (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Además, PIF3 interactúa con *IAA3*, un represor de la señalización de auxinas, que sugiere un mecanismo de control de las auxinas sobre PIF3 (Xie *et al.*, 2021).

Las auxinas son hormonas vegetales que se sintetizan principalmente en los cotiledones (hojas jóvenes) y en el meristema apical y se transportan por el floema al resto de los órganos (Procko *et al.*, 2014, Bellstaedt *et al.*, 2019). La síntesis involucra a las enzimas TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (*TAA1*), SHADE AVOIDANCE 3 (*SAV3*), *TAA1*-RELATED 1 (*TAR1*), y *TAR2* que generan el ácido indol-3-pirúvico (IPA) y luego las enzimas YUCCA (*YUC*) catalizan la conversión de IPA hacia IAA, que es la forma predominante de auxinas en las plantas (Gray *et al.*, 1998). Los niveles de IAA también son regulados negativamente a través de UDP-

GLYCOSYLTRANSFERASE 76F1 (UGT76F1) que glicosila a IPA e inhibe la conversión hacia IAA, regulando la abundancia de la hormona (Chen *et al.*, 2020).

Las auxinas son las principales hormonas responsables del alargamiento celular. Esta respuesta depende de la interacción entre receptores canónicos de auxinas y una red de señalización mediada por factores de transcripción. Los principales receptores de auxinas son las proteínas TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX), que forman parte del complejo de ubiquitinación E3 ligasa SKP1-CULLIN-F BOX (SCF), y los co-receptores AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA). Cuando los niveles de auxina son bajos, las proteínas Aux/IAA se unen a los factores de transcripción AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) y reclutan represores de la transcripción, inhibiendo la expresión de genes inducibles por auxinas (Weijers & Wagner, 2016). En cambio, cuando la concentración de auxina aumenta, la hormona se une al complejo TIR1/AFB y a los co-receptores Aux/IAA. Esta interacción promueve la ubiquitinación de Aux/IAA, marcándolas para su degradación en el proteasoma. Como resultado, los ARFs quedan liberados y activan la transcripción de genes, entre ellos la familia SMALL AUXIN UP RNA (SAURs) (Ulmasov *et al.*, 1997, Hagen *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2020). Dentro de esta familia, los genes *SAUR19* - *SAUR24*, que aumentan la expresión en respuesta a temperaturas cálidas (Stavang *et al.*, 2009; Franklin *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2021), codifican proteínas que se unen y reducen la actividad de las fosfatasa PP2C-D, lo que impide la desfosforilación y, por ende, la inactivación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática. La actividad de esta ATPasa es clave para la acidificación del apoplasto, proceso que activa a las expansinas, proteínas que rompen los puentes de hidrógeno en la pared celular y permiten la expansión celular (Cosgrove 2005, Spartz *et al.*, 2014). Este mecanismo genera la elongación celular de las células del hipocotilo, por lo que la respuesta de elongación del hipocotilo que ocurre en temperaturas cálidas está intrínsecamente relacionada con el aumento de auxinas.

Río abajo de la vía de señalización de auxinas, se encuentran los genes *BES1* y su homólogo BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (*BZR1*), activados por los brasinoesteroides. Aunque aún no se ha determinado si *BES1* y *BZR1* aumentan debido a la estimulación de la vía de brasinoesteroides por las auxinas o a un mecanismo directo de las auxinas, de una forma u otra, la señalización de las auxinas proveniente

de los cotiledones es percibida en el hipocotilo donde las proteínas BES1 y BZR aumentan su abundancia nuclear favoreciendo el crecimiento del hipocotilo (Costigliolo Rojas *et al.*, 2022, Yu *et al.*, 2023).

Mecanismos de acción de los termosensores

phyB y ELF3 inhiben mientras que PIF7 promueve el crecimiento del hipocotilo en temperaturas cálidas. A continuación, se desarrollan los mecanismos conocidos por los cuales phyB, ELF3 y PIF7 perciben y modifican su actividad en respuesta a la temperatura.

phyB

phyB se sintetiza en el citoplasma y se une espontáneamente al cromóforo fitocromobilina, formando su estado inactivo, Pr, el cual absorbe principalmente luz roja ($\lambda = 660 \text{ nm}$) (Quail *et al.*, 1995, Burgie *et al.*, 2014). La percepción de luz roja induce un cambio conformacional hacia la forma activa, Pfr, que puede volver a Pr tras la absorción de luz roja lejana ($\lambda = 730 \text{ nm}$) (Quail *et al.*, 1995, Burgie *et al.*, 2014). Además de la regulación por luz, Pfr también puede revertir a Pr en respuesta al aumento de temperatura, un proceso conocido como reversión térmica (**Figura 2**). La reversión térmica es una propiedad intrínseca de phyB que ocurre por la extensión del N-terminal (Burgie *et al.*, 2021), sitio donde además puede ser fosforilado en varios residuos aminoácidos (Medzihradzsky *et al.*, 2013, Nito *et al.*, 2013, Viczián *et al.*, 2020). En particular, la fosforilación del residuo S86 acelera la reversión térmica y disminuye la formación de condensados nucleares (Medzihradzsky *et al.*, 2013). Por lo tanto, hay mecanismos que estabilizan o desestabilizan la actividad de phyB. Además, la reversión térmica es regulada por otros factores: se reduce con la exposición prolongada a la luz (Rausenberger *et al.*, 2010) y está modulado por al menos dos proteínas, PHOTOPERIODIC CONTROL OF HYPOCOTYL 1 (PCH1) y su homólogo PCH1-LIKE (PCHL), que interactúan físicamente con phyB, disminuyen la tasa de reversión térmica y favorecen la formación de condensados nucleares (Enderle *et al.*, 2017, Huang *et al.*, 2019, Huang *et al.*, 2016).

phyB es capaz de formar homodímeros (Pr-Pr o Pfr-Pfr) y heterodímeros. Sin embargo, aunque la luz y la temperatura pueden afectar la estabilidad y actividad de phyB independientemente de su estado de oligomerización, sólo el homodímero Pfr-Pfr se considera biológicamente activo (Klose *et al.*, 2015). La forma activa de phyB se

transloca rápidamente del citoplasma al núcleo, donde tiene actividad biológica (Huq *et al.*, 2003, Yamaguchi *et al.*, 1999) y donde forma condensados nucleares (Legris *et al.*, 2014, Park *et al.*, 2018, Pham *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2022, Xie *et al.*, 2023). Si Pfr se convierte nuevamente en Pr por efecto de la luz roja lejana o temperaturas cálidas, los condensados se desensamblan; sin embargo, phyB no sale del núcleo (Legris *et al.*, 2014, Klose *et al.*, 2015). Esto ocurre porque la velocidad de ensamblaje y desensamblaje de los condensados no es igual y depende de la composición de phyB. En el caso de Pfr-Pfr, el ensamblaje de los cuerpos nucleares es más rápido que el desensamblaje (una vez que los condensados se forman, tienden a ser estables), pero para Pfr-Pr el ensamblaje es más lento que el desensamblaje (la presencia de Pr interfiere con la formación eficiente de los condensados), y en el caso de Pr-Pr el ensamblaje es insignificante (no se forman condensados porque esta forma no participa en la separación de fases dentro del núcleo) y el desensamblaje es total (Klose *et al.*, 2015). No obstante, aunque phyB sólo forma condensados en su conformación Pfr, en temperaturas frías la cantidad de Pfr es mayor que en otras condiciones térmicas y sin embargo el tamaño de los condensados es menor que en temperaturas templadas (Legris *et al.*, 2016), evidenciando que el tamaño de los condensados no es un buen parámetro para inferir la actividad de phyB, o al menos no lo es en todo el rango de temperaturas. Por otra parte, no está claro si la temperatura afecta la abundancia de phyB, ya que se han reportado, por un lado, resultados que indican que las temperaturas cálidas incrementan la abundancia de la proteína phyB a través de mecanismos postranscripcionales (Hahm *et al.* 2020) y, por otro lado, que permanecen constantes entre temperaturas templadas y cálidas tanto los niveles de transcripción de *PHYB* como la cantidad de la proteína (Jung *et al.*, 2016). Los

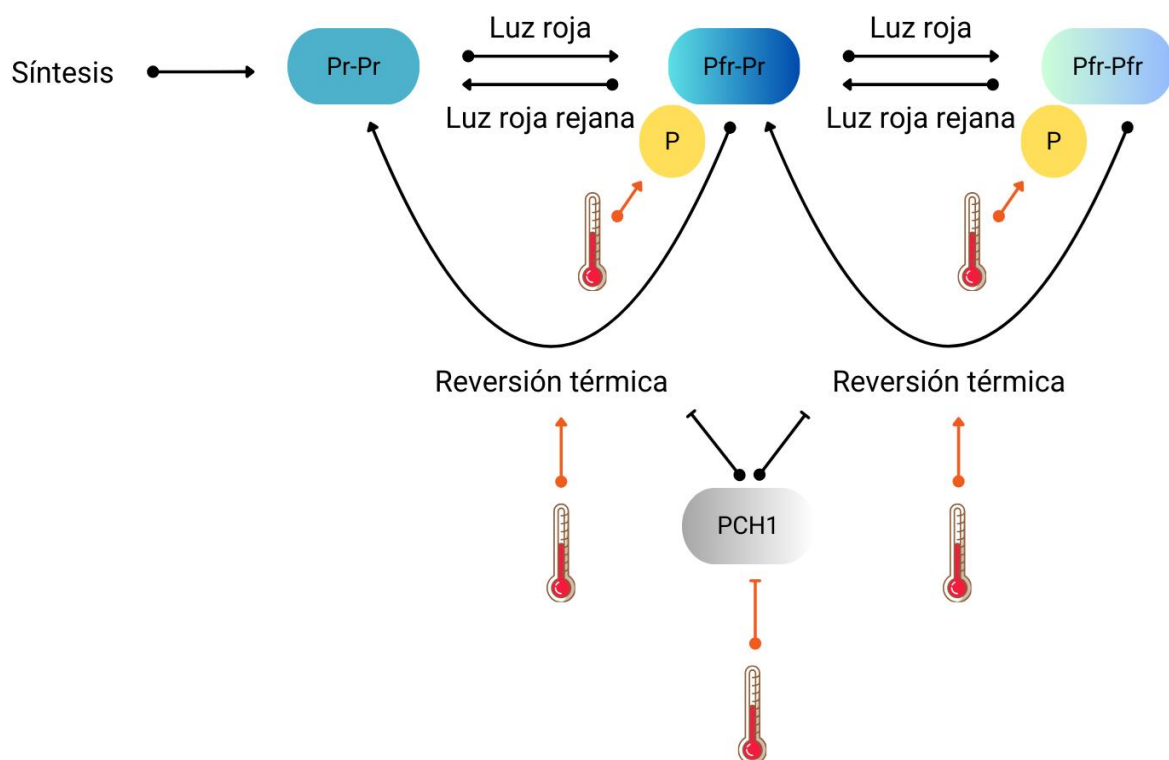


Figura 2. Mecanismo de percepción de la temperatura de phyB. La forma inactiva (Pr) absorbe luz roja y se transforma en su forma activa (Pfr). Las distintas combinaciones posibles de phyB son homodímeros (Pr-Pr / Pfr - Pfr) o heterodímeros (Pfr - Pr). La luz roja lejana y temperaturas cálidas (termómetro) generan reversión. La temperatura también afecta el nivel de fosforilación en el residuo S86 y la abundancia de PCH1, que regulan a favor de la reversión. Las flechas indican promoción de la expresión y la flecha partida la inhibición. Adaptado de Casal *et al.*, 2024.

resultados entre uno y otro pueden deberse a diferencias experimentales como momentos del día y duración del pulso de temperatura.

ELF3

ELF3 regula la actividad de los PIFs por interacción directa proteína-proteína (Box *et al.*, 2015, Nieto *et al.*, 2015, Jiang *et al.*, 2019) y por regulación de la expresión génica (Nusinow *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2020). Esta regulación de forma dependiente de la temperatura ocurre por una repetición de poliglutamina (poliQ) en el extremo C-terminal, similar al dominio de priones (PrD) (Jung *et al.*, 2020), que en respuesta a la temperatura forma condensados, al igual que phyB. Sin embargo, temperaturas cálidas pueden ensamblar o desensamblar los condensados según las condiciones experimentales, y en cada situación se propone una interpretación diferente sobre la actividad de ELF3 (Ronald *et al.*, 2021, Jung *et al.*, 2020, Murcia *et al.*, 2022). En el caso donde temperaturas templadas favorecen la formación de condensados y temperaturas cálidas los desarman, se sugiere que en los condensados ELF3 está

transcripcionalmente activo inhibiendo a los PIFs (Ronald *et al.*, 2021). Pero otra interpretación es propuesta cuando los condensados sólo se forman en temperaturas cálidas, según la cual los condensados son focos que inhiben la acción de ELF3 (Jung *et al.*, 2020, Murcia *et al.*, 2022). Hay que tener en cuenta que es posible que ELF3 interactúe con muchas proteínas (Huang *et al.*, 2016) y según el momento del día o el tejido analizado, la composición de los condensados puede ser diferente y esto podría afectar la respuesta de ELF3 a la temperatura y explicar las diferencias entre los distintos trabajos. Por esos motivos, la dinámica de los condensados nucleares de ELF3 no es sencilla de interpretar.

PIF7

A diferencia de ELF3 y phyB, PIF7 es un termosensor que promueve la elongación del hipocótilo en respuesta a temperaturas cálidas. La región 5'-UTR del ARN mensajero de *PIF7* contiene una horquilla ubicada aproximadamente 30 nucleótidos río arriba del codón AUG de inicio y temperaturas cálidas causan un desdoblamiento parcial de la horquilla y una conformación más relajada (Chung *et al.*, 2020). Esta conformación alternativa es estable hasta 32°C y mejora selectivamente la traducción de la transcripción *PIF7*, lo que lleva a una mayor síntesis de proteínas (Chung *et al.*, 2020). Además de su acción a través de este mecanismo de detección primario que controla la traducción, la temperatura afecta la expresión del gen *PIF7*. Además, es probable que la estabilidad de la proteína de PIF7 sea controlada por phyB y por ELF3, ya que interactúan físicamente con PIF7, controlando la capacidad de unirse a los promotores de los genes blanco.

Además de su papel en la detección térmica, algunos de estos receptores presentan propiedades físico-químicas particulares que les permiten participar en procesos de organización subcelular mediante la separación de fases líquido-líquido, un fenómeno recientemente reconocido como clave en la regulación de la función celular.

Separación de fases líquido-líquido

Características de la separación de fases en proteínas intrínsecamente desordenadas

La separación de fases líquido-líquido es un fenómeno físico que actualmente está recibiendo especial atención porque desempeña un papel importante en la

organización y regulación de la biología celular. En términos simples, se refiere a la formación de estructuras altamente organizadas por la segregación espontánea de moléculas específicas en dos fases líquidas separadas, como la formación de gotas de aceite en el agua. En las plantas, la separación de fases líquido-líquido define sitios de reacción celular transitorios y está estrechamente vinculado a una variedad de funciones celulares y biológicas desencadenadas por la exposición a varios estímulos internos y externos, como respuestas al estrés, señalización hormonal y detección de temperatura (Kim *et al.*, 2021, Cuevas & Velazquez, 2018).

Las características que los definen son: forma esférica debido a la tensión superficial del líquido, difunden al tocarlos, se fusionan cuando se chocan entre sí, se deforman con la corriente de la fase líquida o con una barrera física, tienen comportamiento similar *in vitro* como *in vivo* y tienen la capacidad de reorganizar su contenido en segundos porque las moléculas no están en estructuras rígidas sino que difunden dentro de los condensados esféricos, como lo demuestra la recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueo (Cuevas-Velazquez & Dinneny, 2018, Hyman *et al.*, 2014).

Este fenómeno ocurre debido a las propiedades físicas de ciertas moléculas multivalentes que pueden autoensamblarse en agregados que pueden coexistir en equilibrio con la fase acuosa. Un ejemplo representativo de moléculas multivalentes son el ADN y el ARN, que contienen múltiples regiones de unión para otros ácidos nucleicos y proteínas y por lo tanto favorecen a la formación de condensados (Strom *et al.*, 2017; Roden & Gladfelter, 2020). Las proteínas intrínsecamente desordenadas son propensas a formar separación de fases líquido-líquido. Estas son aquellas con regiones intrínsecamente desordenadas, dominios plegados o dominios similares a priones con enriquecimiento de aminoácidos polares y cargados (Cascarina *et al.*, 2020). Las regiones desordenadas, sin una estructura 3D definida y con mayor flexibilidad conformacional, favorecen las interacciones multivalentes proteína-proteína y proteína-ácido nucleico (Bah & Forman-Kay, 2016). A su vez, las interacciones multivalentes disminuyen la solubilidad de los componentes condensados debido a los efectos impulsados por la entropía, promoviendo la separación de fases (Lin *et al.*, 2015).

Factores que regulan la separación de fases líquido-líquido

Hay factores que modulan la estabilidad de la separación de fases líquido-líquido, como la concentración de las proteínas. En una concentración de saturación (C_2), las proteínas se asocian para formar una fase densa separándose de la fase diluida. Al aumentar la concentración por encima de C_2 , el exceso de proteína se redistribuye hacia la fase densa, incrementando su volumen, mientras las concentraciones de ambas fases se mantienen constantes (Alberti, 2017). Esto ocurre porque al aumentar la concentración de las proteínas, las interacciones entre ellas se intensifican. La **Figura 3** ilustra un diagrama de fases para un sistema simplificado de dos componentes (proteína y solvente), en el cual se representa la separación de fases líquido-líquido en función de la concentración de proteína y la temperatura, porque la temperatura (al igual que la fuerza iónica, el pH y el estado redox) es un parámetro ambiental que modifica las interacciones entre las moléculas que forman parte de los condensados (Nott *et al.*, 2015, Onuchic *et al.*, 2019, Adame-Arana *et al.*, 2020).

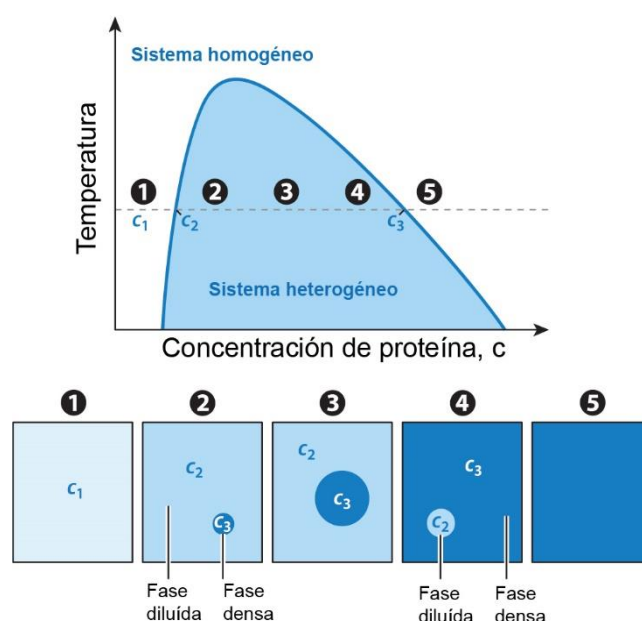


Figura 3. Diagrama de fase que representa la separación de fases líquido-líquido en función de la concentración de proteína y la temperatura. La región blanca corresponde a un sistema homogéneo (fase única), mientras que el área azul indica condiciones bajo las cuales el sistema se vuelve heterogéneo y coexisten dos fases: una diluida (pobre en proteína) y una densa (rica en proteína). En la parte inferior, se esquematizan cinco escenarios posibles a una temperatura fija (línea gris punteada): (1) baja concentración, solución homogénea; (2) concentración de saturación (C_2), inicio de separación de fases; (3) aumento de la fracción de la fase densa; (4) inversión de fases, con gotas diluidas en un fondo denso; (5) solución homogénea a alta concentración, fuera del dominio de separación de fases. Adaptado de Alberti *et al.*, 2019.

En particular, la temperatura influye en la estabilidad, formación y dinámica de los condensados líquidos en las células (Cuevas-Velazquez & Dinneny, 2018, Kim *et al.*, 2021, Emenecker *et al.*, 2021). Al aumentar o disminuir la temperatura, la solubilidad de los componentes puede cambiar, favoreciendo o inhibiendo la formación de condensados. Además, la temperatura cambia la viscosidad y fluidez: a bajas temperaturas, los condensados tienden a ser más rígidos y viscosos, mientras que a temperaturas más altas tienden a ser más dinámicos y líquidos, e incluso disolverse si el calor es excesivo (Emenecker *et al.*, 2021). El aumento de temperatura también incrementa la energía cinética del sistema, lo que favorece los encuentros moleculares y, por lo tanto, la separación de fases. Sin embargo, temperaturas demasiado elevadas pueden desnaturalizar proteínas, alterando su estructura y función, y esto puede resultar en la pérdida de las interacciones necesarias para mantener el equilibrio entre las fases (Emenecker *et al.*, 2021). En la **Figura 3** también se representa cómo la temperatura afecta la separación de fases en relación con la concentración de proteínas.

Separación de fases en el citoplasma

En el citoplasma ocurre separación de fases líquido-líquido mayormente con proteínas asociadas a moléculas de ARN, como los gránulos de estrés (Molliex *et al.*, 2015; Protter & Parker, 2016; Van Treeck *et al.*, 2018) y los cuerpos de procesamiento (Huang *et al.*, 2024, Kearly *et al.*, 2024).

Los gránulos de estrés son condensados que se forman en algunos estreses ambientales, como en temperaturas muy altas estresantes o hipoxia (Kosmacz *et al.*, 2019) y están conformados por proteínas que se unen al ARNm para evitar su degradación, factores de iniciación de la traducción, y otros componentes (Kim *et al.*, 2021, Chantarachot & Bailey-Serres, 2018; Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015; Lokdarshi *et al.*, 2016; Sorenson & Bailey-Serres, 2014). Son estructuras altamente dinámicas, porque se recuperan rápidamente luego del fotoblanqueo (FRAP) y se desarman rápidamente luego del estrés con una recuperación en temperatura templada (Zhu *et al.*, 2022, Kim *et al.*, 2021). Su formación fue asociada a la protección de ARN mensajeros de los factores de transcripción *HEAT SHOCK FACTORS (HSFs)* y de las chaperonas *HEAT SHOCK PROTEINS (HSPs)* (Tong *et al.*, 2022), que trabajan en conjunto para mejorar la termotolerancia (Ohama *et al.*, 2017, Ren *et al.*, 2019, Zhao

et al., 2020) y al aumento de la tolerancia a la temperatura y de la supervivencia de las plantas (Zhu *et al.*, 2022, Kim *et al.*, 2021).

Los cuerpos de procesamiento también se unen a moléculas de ARN pero su función está asociada a la represión de la traducción, la degradación y el almacenamiento a nivel postranscripcional (Huang *et al.*, 2024, Kearly *et al.*, 2024). Estas son estructuras menos dinámicas que los gránulos de estrés y están presentes en las células independientemente del estrés, aunque su dinámica y movilidad podrían verse afectadas por diferentes condiciones ambientales (Kearly *et al.*, 2024). Por ejemplo, en respuesta a temperatura muy alta, la proteína DCP2 que está asociada a la formación de cuerpos de procesamiento, forma condensados en temperaturas muy altas que se asumen cuerpos de procesamiento (Motomura *et al.*, 2015). Dado que los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento comparten proteínas e incluso pueden intercambiar ARN mensajeros entre ellos (Gutiérrez-Beltrán *et al.*, 2015), es posible que temperaturas extremadamente altas induzcan la formación de ambos tipos de condensados. En este contexto, algunas proteínas podrían asociarse preferentemente a una u otra estructura según su función específica. Por otra parte, la formación de cuerpos de procesamiento no fue asociada al aumento de tolerancia o supervivencia en las plantas.

Separación de fases en el núcleo

Como se mencionó anteriormente, phyB forma condensados nucleares (Legris *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2022). Estos condensados tienen forma esférica, pueden fusionarse rápidamente en condensados nucleares más grandes y recuperarse en unos pocos minutos después del fotoblanqueo, tanto en células vegetales como en mamíferos (Chen *et al.*, 2022). Además, phyB tiene una región intrínsecamente desordenada en el extremo N-terminal que en temperatura modula la disolución de las gotas de phyB (Chen *et al.*, 2022). En el extremo C-terminal se produce la oligomerización espontáneamente que induce condensados similares a líquidos (Chen *et al.*, 2022). En conjunto, estos resultados demuestran un mecanismo termosensorial mediado por la separación de fases líquido-líquido en el núcleo. Por otra parte, en los condensados nucleares de phyB hay, además de dímeros de phyB, otras proteínas que interactúan directa e indirectamente con phyB, como PIF4, PIF7 y ELF3 (Bauer *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 2022, Kim *et al.*, 2023). Por eso, la condensación podría ser un

mecanismo biológico para aumentar el tiempo de la actividad de phyB, elevando la probabilidad de eventos de señalización (Casal *et al.*, 2024).

Otro caso en el que se presentan condensados nucleares es el del termosensor ELF3. Como ya se mencionó, ELF3 posee un dominio PrD, que es esencial en la percepción de la temperatura, ya que variantes de ELF3 con PrD mutado no pueden responder a temperaturas cálidas (Jung *et al.*, 2020). La expresión del dominio similar a priones de ELF3 *in vitro* forma una fase diluida homogénea, pero forma gotas líquidas en respuesta a temperaturas más altas (Hutin *et al.*, 2023, Jung *et al.*, 2020). Estas gotas son móviles en solución y pueden fusionarse, lo que indica la capacidad intrínseca del dominio similar a priones de ELF3 para experimentar una separación de fases líquido-líquido. En células vegetales, ELF3 forma condensados esféricos nucleares que recuperan parcialmente la fluorescencia después del fotoblanqueo (Hutin *et al.*, 2023). Esto evidencia que ELF3 forma condensados nucleares por separación de fases líquido-líquido.

En síntesis, los termosensores phyB y ELF3 forman condensados por separación de fases en respuesta a la temperatura y regulan la concentración de genes y proteínas involucradas en el crecimiento.

Inhibición del crecimiento por temperaturas muy altas

Diversos estudios han demostrado que las tasas de desarrollo vegetal, como la elongación foliar, la división celular o la germinación, siguen curvas de respuesta a la temperatura con un óptimo específico (T_o) para cada especie. En *Arabidopsis*, por ejemplo, se ha observado que la elongación del hipocotilo aumenta progresivamente con la temperatura hasta alcanzar un valor máximo cercano a los 30 °C (Quint *et al.*, 2016). Temperaturas más altas son consideradas estresantes y reducen el crecimiento y desarrollo de los órganos (Rebecca Lippmann *et al.*, 2019, Legris *et al.*, 2014). Este patrón también se extiende a numerosos cultivos. En especies agronómicas como sorgo, maní, algodón, mijo, maíz, arroz, poroto alubia y poroto común, el T_o se sitúa por encima de los 30 °C, alcanzando valores de 34.1 ± 1.5 °C (Parent & Tardieu, 2012). No obstante, una vez superado ese umbral, los procesos de desarrollo y expansión celular comienzan a declinar, evidenciando una inhibición del crecimiento. A su vez, aunque estas especies muestran un rango térmico amplio —manteniendo tasas de desarrollo cercanas al máximo hasta los 40–42 °C—, temperaturas persistentemente elevadas pueden generar efectos negativos e incluso irreversibles sobre el crecimiento

y la productividad (Parent & Tardieu, 2012). Estas observaciones resaltan la existencia de un límite superior térmico común en múltiples especies, a partir del cual se compromete la elongación de órganos y se activan respuestas de estrés, cuyos mecanismos aún no han sido completamente caracterizados.

En plantas de *Arabidopsis*, la inhibición del crecimiento del hipocotilo en temperaturas mayores a 30 °C se ha reportado previamente (Orbović & Poff, 2007, Rebecca Lippmann *et al.*, 2019), incluso en trabajos de nuestro grupo (Legris *et al.*, 2014). Sin embargo, a diferencia del gran avance en el entendimiento de la respuesta en temperaturas cálidas, de los genes involucrados, los patrones de expresión y de los mecanismos mediante los cuales se promueve el crecimiento del hipocotilo (Quint *et al.*, 2016, Quint *et al.*, 2021, Romero-Montepaone *et al.*, 2021, Casal & Balasubramanian, 2019), aún no se conocen los mecanismos que llevan a inhibición del crecimiento por temperaturas muy altas.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue investigar los mecanismos mediante los cuales las altas temperaturas inhiben el crecimiento del hipocotilo en *Arabidopsis thaliana*. Para eso se establecieron objetivos específicos:

- Evaluar los cambios a nivel del transcriptoma producidos como resultado de la exposición a temperaturas frías, templadas, cálidas o muy altas.
- Evaluar la hipótesis (derivada de los resultados asociados al primer objetivo) de que la modulación de la vía de auxinas participa en la regulación de la inhibición del crecimiento en temperaturas muy altas.
- Evaluar la hipótesis (derivada de los resultados asociados al segundo objetivo) de que la regulación del módulo phyB-PIF4-PIF7 (involucrado en el control de auxina por temperatura) inhibe el crecimiento del hipocotilo.
- Evaluar la hipótesis (derivada de los resultados asociados al tercer objetivo) de que la actividad inhibitoria de phyB se recupera en temperaturas muy altas.
- Evaluar la participación de ELF3 (que controla las actividades de PIF4 y PIF7) en la respuesta a temperaturas.

Los resultados de esta tesis están organizados en cinco capítulos, cada uno de ellos relacionado a uno de los objetivos enunciados arriba. Los materiales y métodos, discusión y conclusión de la tesis se presentan en conjunto para los cinco capítulos, con la finalidad de evitar la repetición e integrar la información obtenida.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

Criterios de búsqueda de datos de transcriptoma

El meta-análisis es un proceso que puede llevarse a cabo de muchas maneras distintas. En este trabajo se siguieron las reglas establecidas en Forero *et al.*, 2019. Los datos de secuenciación del transcriptoma (*RNA-seq*, abreviado del inglés) se descargaron del repositorio NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y pertenecen a trabajos publicados. Como criterio de búsqueda, se fijaron los siguientes parámetros: plantas de *Arabidopsis thaliana* del genotipo salvaje Columbia-o (Col-o) crecidas en cualquier estadio y condición de crecimiento común (día largo, día corto o luz continua) entre 20 - 23 °C y con un cambio hacia temperaturas mayores o menores con una duración mínima de 1 hora y máxima de 24 horas. Solamente se utilizaron estudios que hayan tenido al menos dos réplicas biológicas. Las publicaciones utilizadas fueron un total de 19; las condiciones de crecimiento y de temperatura se listan en la **Tabla 1, Anexo**.

Las temperaturas en las que encontramos experimentos que cumplieran con las condiciones de búsqueda fueron: 4 °C, 10 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 37 °C, 38 °C, 44 °C y 47 °C.

Descarga y alineamiento de secuencias

Los SRA (*The Sequence Read Archive*, en inglés) de cada experimento se descargaron utilizando el servidor *Galaxy* (<https://usegalaxy.eu/>) que también se utilizó para alinear las secuencias contra el transcriptoma de referencia de *Arabidopsis* (Araport 11, TAIR), a través de *HISAT2*. En algunos casos se removieron adaptadores usando la función *Trimm Galore* y en otros casos se procesaron los datos, para mejorar el alineamiento de las secuencias, con *trimmomatic*. A partir de cada archivo BAM (*Binary Alignment/Map Format*, en inglés) se obtuvieron las lecturas de las secuencias (*counts*) usando la función *Feature Counts*. Se normalizó el tamaño de la librería de cada experimento usando el paquete *VOOM* en el programa R (R Core Team, 2013).

Análisis estadístico de los datos del transcriptoma

Para cada experimento, se utilizaron *counts* normalizadas para calcular el promedio de cada temperatura control (20 °C, 22 °C o 23°C, según el caso) y luego calculamos el logaritmo base 2 del Fold Change de la expresión. Luego se realizó un

ANOVA de un factor, donde el factor fue la temperatura. Para cada uno de los genes que resultaron significativos en el ANOVA ($FDR < 0.001$) se calculó el promedio de expresión por grupo de temperatura. Dichos genes fueron clasificados en cuatro grupos, dependiendo de si el máximo de expresión se encontraba a temperatura fría (4 - 10 °C), templada (20- 23 °C), cálida (27 - 29 °C), o muy alta (37 - 47 °C).

Términos ontológicos sobrerrepresentados

Se utilizó *Gene Ontology* (<https://geneontology.org/>) para identificar los términos ontológicos enriquecidos en los grupos de genes, con la categoría “procesos biológicos” con el análisis estadístico de Fisher ($FDR < 0.05$, $FE > 2$).

Material Vegetal

Todos los experimentos se realizaron con plantas de *Arabidopsis thaliana*. El genotipo salvaje utilizado fue Columbia (Col-0). Los alelos mutantes utilizados fueron *phyB-9* (Reed *et al.* 1993); *35S:PHYB[S86A]-YFP*, *pPHYB:PHYB[S86A]-YFP*, *35S:PHYB[S86D]-YFP*, *pPHYB:PHYB[S86D]-YFP* (*phyA-211 phyB-9*) (Ádám *et al.*, 2011, Viczan *et al.*, 2020); *pchl1*, *pchl*, *pchl1 pchl* (Enderle *et al.*, 2017, Murcia *et al.*, 2020); *elf3-1*, *elf3-8* (Hicks *et al.*, 2001); *elf3-4*, *elf3-9* (Zagotta *et al.*, 1996); *pif7-1* (Tognaca *et al.*, 2017); *pif7-2* (Leivar *et al.*, 2008); *pif4-101* (Lorrain *et al.*, 2008); *pif5-3* (Fujimori *et al.*, 2004); *pif3-3* (Monte *et al.*, 2004), *hy5-221* (Shin *et al.*, 2007); *bes1-D* (Yin *et al.*, 2002); *bzr1-D* (Wang *et al.*, 2014), *sav3* (Romero-Montepaone *et al.*, 2021); *yuc3/5/7/8/9* (*yucQ*) (Tao *et al.*, 2008); *saur19/20/21/22/23/24* (*saur 19-24*, alelos # 12 y # 17) (Pereyra *et al.*, 2023).

Para estudiar la abundancia y localización de proteínas por microscopía confocal, se utilizaron plantas transgénicas que expresan el gen de interés fusionado a los genes reporteros que expresan proteínas fluorescentes. Para *phyB* se usó *pUBQ10:PHYB-YFP* (*phyB-9*) (Zhang *et al.* 2013), *p35S:PHYB-GFP* (*phyB-9*) (Reed *et al.*, 1993) y *pPHYB:PHYB-YFP* (*phyb-9*) (Vicziai *et al.*, 2019). Para analizar la abundancia y localización de *ELF3* se utilizó la línea *p35S::YFP-ELF3* (*elf3-4*) (Ronald *et al.*, 2021). Para *PIF4* se utilizó *pPIF4:PIF4-GFP* (*pif4-1*) (Pucciariello *et al.*, 2018). La caracterización de *BES* se hizo usando *pBES1::BES1-GFP* (*bes1*) (Yin *et al.*, 2002) y para *HY5* utilizamos *35S:HY5-GFP* (*hy5-215*) (Lee *et al.*, 2021). Para el estudio de auxinas por microscopía utilizamos el sensor de auxinas, *AuxSen* (Herud-Sikimić *et al.*, 2021), los reporteros de actividad transcripcional de ARFs, *pDR5:GFP-NLS* y *pDR5:GFP* (Liao *et al.*, 2015), el reportero de estabilidad de proteínas *Aux/IAA*

35S:DII-Venus (Brunoud *et al.*, 2012), el reportero del receptor de auxina *TIR1* *pTIR1:TIR1-mCitrine* (*tir1-10*) (Prigge *et al.*, 2019). Como reportero de pH se utilizó Apo-pHluorin (Martinière *et al.*, 2018).

Para la cuantificación de la abundancia de proteína utilizamos líneas de *pPIF7:PIF7-3HA-tPIF7* (*pif7-2*) (Costa Galvão *et al.*, 2019) y *pPIF4:PIF4-HA* (Martinez *et al.*, 2018), además de *pPHYB:PHYB-YFP* y *p35S:PHYB-GFP* ya mencionadas para microscopía confocal.

Para la expresión de genes o proteínas por bioluminiscencia se utilizaron las líneas transgénicas *pELF3:LUC* (Nieto *et al.*, 2021), *pELF3:ELF3-LUC* (Nieto *et al.*, 2021), *pPIF4:LUC* (Nieto *et al.*, 2021), *pPIF4:PIF4-LUC* (Nieto *et al.*, 2021), *pPIF4:LUC* (*elf3-8*) (Murcia *et al.*, 2022) y *pHFR1:LUC* (Murcia *et al.*, 2022).

Condiciones de crecimiento para los experimentos

Las semillas se sembraron sobre agar/agua 0.8% en cajas de acrílico de 3 cm x 4 cm x 2 cm (largo-ancho-alto). Se estratificaron durante 3-5 días a 4 °C en oscuridad. Luego fueron trasladadas a las condiciones de crecimiento: fotoperíodo de 10 h de luz y 14 h de oscuridad, en cámaras de 22 °C durante 3 días. Una hora después del comienzo del día 4 fueron transferidas a distintas temperaturas (10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C). Las observaciones fueron tomadas luego de 4 horas, 8 horas, o 9 horas de tratamiento según se indica en cada figura. Durante el fotoperíodo las plantas fueron expuestas a 80 $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de radiación fotosintéticamente activa (400 - 700 nm) y una relación de luz roja y luz roja lejana de 1 (comparable con la luz solar), provista por una combinación de lámparas LED y lámparas halógenas.

Medición del alargamiento del hipocotilo

Las cajas de acrílico se colocaron con el agar en posición vertical, con el fin de poder registrar el tamaño de las plantas mediante fotografías. Al principio del tratamiento y luego de 9 horas de tratamiento (final del día) se tomaron fotos de cada caja conteniendo plantas con una cámara Canon Powershot SX530 HS. Las imágenes fueron analizadas con el *software Global Mapper*. Mediante este *software* se adjudicaron coordenadas específicas a las dos imágenes de cada plántula, de modo de superponerlas precisamente. Luego se identificó el extremo superior de cada planta en cada foto y comparando estas coordenadas se calculó la elongación durante las 9 horas de tratamiento como la distancia entre estos dos puntos.

Experimentos combinados de luz y temperatura para *phyB*

Para estos ensayos se utilizaron luces LED que proveen exclusivamente luz roja ($\lambda = 660 \text{ nm}$) o luz roja lejana ($\lambda = 730 \text{ nm}$). Una hora luego del inicio del fotoperíodo, las plantas se sometieron a tres tipos de tratamientos de luz: (a) un pulso de luz roja (5 min, $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) al principio del día seguido de oscuridad; (b) pulsos de luz roja (5 min, $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) cada hora seguidos de 60 min de oscuridad, y (c) un pulso de luz roja lejana (5 min, $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) al principio del día seguido de oscuridad. Las plantas tratadas fueron a su vez expuestas a 28°C o 37°C , inmediatamente después de finalizado el primer pulso de luz, durante 9 horas y se midió la tasa de elongación del hipocotilo. El mismo experimento se observó por microscopía confocal, pero con un tratamiento de 4 horas.

Cálculo para la medición del impacto fisiológico a partir de experimentos genéticos

Para cuantificar el impacto específico que tiene un gen *X* sobre el crecimiento, se utilizó un modelo matemático basado en dos ecuaciones. La ecuación 1 expresa el crecimiento (*G*) de las plantas de genotipo salvaje (*Col-0*) en función de la división entre el máximo crecimiento teórico (*G* máximo), que es un valor fijo y que se calcula como el crecimiento que tienen plantas de genotipo *phyB* en sombra (simulada con filtros LEE #089) y temperatura de 28°C , y la suma de 1 con el impacto del gen *X* (I_X) y el impacto que tienen otros factores adicionales al gen *X* (I_{otros}). La ecuación 2 expresa el crecimiento de plantas mutantes *x* (mutantes nulas para el gen *X*) donde no está involucrado el impacto del gen *X*. Usando datos de crecimiento se puede despejar de la ecuación 2 el impacto de otros factores (I_{otros}) y reemplazarlo en la ecuación 1, para despejar el impacto del gen *X* en el crecimiento.

Ecuación 1:

$$G_{\text{Col-0}} = \frac{G_{\text{máximo}}}{1 + I_X + I_{\text{otros}}}$$

Ecuación 2:

$$G_x = \frac{G_{\text{máximo}}}{1 + I_{\text{otros}}}$$

En las ecuaciones se incluye un término + 1 para que, en ausencia de factores que limiten el crecimiento ($I_X = 0$, $I_{\text{otros}} = 0$), este alcance el máximo valor teórico (*G* máximo). Si el gen *X* es inhibitorio del crecimiento, su ausencia en el mutante

permitirá un mayor crecimiento ($G_X > G_{Col-o}$), obteniendo un valor positivo de I_X . Por el contrario, si el gen X promueve el crecimiento, su ausencia reduce el crecimiento ($G_X < G_{Col-o}$), resultando en un valor negativo de I_X . Para unificar la interpretación, los valores negativos (promotores) se multiplicaron por -1, expresando así la magnitud del impacto promotor en términos positivos.

Microscopía confocal

Las imágenes de microscopía de fluorescencia confocal se tomaron con el microscopio confocal Zeiss LSM 510 Meta. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite (Plan-Apochromat 40 x / 1,2; Zeiss). La proteína *aquamarin* se excitó con un láser de Argón ($\lambda = 405$ nm) para la medición de la relación FRET utilizando cinco canales fluorescentes (canal 1: 419–455 nm, canal 2: 454–491 nm, canal 3: 490–526 nm, canal 4: 525–562 nm y canal 5: 561–598 nm); posteriormente, se cuantificó la relación entre los canales 4 y 2. Para observar las proteínas fusionadas a GFP y YFP, mCitrina y DII-VENUS, se excitó con un láser de Argón ($\lambda = 488$ nm) y se detectó la fluorescencia utilizando un filtro BP 505-530, 505-550 y 505-570, respectivamente. Como los cloroplastos presentan una fuerte autofluorescencia y las clorofilas se excitan y emiten fluorescencia en rangos de longitud de onda dentro de los empleados para la excitación y detección de las proteínas fluorescentes, se usó un canal independiente con un láser de excitación He-Ne ($\lambda = 543$ nm) y un filtro LP 630 para detectar clorofila y poder distinguir cloroplastos en el canal de las proteínas fluorescentes.

Para cuantificar la fluorescencia nuclear total, se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 710 NLO que permite separar la señal que emiten las proteínas fluorescentes de la señal de los cloroplastos.

En todos los casos las imágenes se tomaron de la epidermis o de las primeras capas subepidérmicas. Los órganos observados se aclaran en cada caso (cotiledones e hipocotilos). En el caso de phyB y de ELF3 las imágenes se tomaron en dos pasos: primero se realizó una imagen del área a analizar, y luego se realizaron ampliaciones 8 x de esa imagen en las zonas de interés, tomando un núcleo por cada foto, y ajustando el foco en cada foto con el fin de optimizar la visualización de condensados nucleares.

Para cuantificar la abundancia nuclear de todos los reporteros de microscopía se utilizó el programa Fiji (Cardona *et al.*, 2012). Las imágenes obtenidas contaban con un canal de detección de la clorofila y otro para detectar GFP, YFP, mCitrina o

VENUS, según la planta transgénica. Los núcleos se identificaron por su forma ahusada, comprimidos contra la pared celular, y en muchos casos se lograba identificar el nucléolo. En algunos casos donde fue necesario, las plantas se fijaron sumergiéndose en 1 % Paraformaldehído en PBS 1 x, aplicando vacío por 12 segundos y realizando tres lavados (dos de 30 minutos con NH₄Cl y uno de 5 minutos con PBS 1 x). Las plantas fijadas se dejaron suspendidas en PBS 1x con una solución final de DAPI 0.02 % durante una noche y se observaron por microscopía confocal al día siguiente usando un láser de $\lambda = 405 \text{ nm}$ y se detectando la fluorescencia con un filtro BP 420-490.

La fluorescencia nuclear promedio se midió cuantificando la intensidad promedio del canal correspondiente a la proteína fluorescente en las zonas identificadas como núcleos. Además, se contó el número de núcleos identificados. Por otro lado, utilizando el canal de transmisión y el de clorofila se midió el tamaño de 5-10 células y el tamaño total del área fluorescente. De esta forma se calculó el número de células en el campo para relativizar la medición de fluorescencia nuclear promedio, porque el área de las células es afectada por los tratamientos de temperatura. La fluorescencia nuclear promedio se calculó como:

$$\text{Fluorescencia nuclear promedio} = \frac{\text{Número de núcleos} \times \text{brillo nuclear promedio}}{\text{Número de células por campo}}$$

Para cuantificar el área de los condensados nucleares se utilizó un método automático de análisis desarrollado en el programa Icy (Chaumont *et al.*, 2012, Legris *et al.*, 2016).

Medición de bioluminiscencia

Para las mediciones de bioluminiscencia la siembra se hizo en placas de 96 pocillos. Las plantas crecieron en las condiciones de crecimiento ya descritas y se agregó 30 μl de 0,5 mM D-Luciferina al final del segundo día a cada pocillo (Karayekov *et al.*, 2013). Una hora después del comienzo del cuarto día, las placas de las plántulas se transfirieron a los tratamientos de temperatura. A las 4 horas se detectó actividad luciferasa usando Varioskan LUX (*Thermo Scientific*). La señal de luminiscencia fue registrada como cuentas por segundo, durante tres segundos sucesivos por pocillo. Los valores obtenidos fueron normalizados a los de 10°C por genotipo.

Blots de proteínas

La abundancia de las proteínas de PIF7, PIF4 y phyB se evaluaron mediante *blots* de proteínas en plántulas crecidas en placas 3 cm x 4 cm x 2 cm (largo-ancho-alto) horizontalmente en las condiciones de crecimiento descriptas y cosechadas luego de 4 horas de tratamiento de temperatura, que inició una hora después del comienzo del fotoperíodo del día 4. De cada réplica se cosecharon alrededor de 50 mg de plántulas, se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron con un mortero hasta obtener un polvo fino. La extracción de proteínas totales se hizo con un buffer conteniendo 125 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2% SDS, 10% Glicerol, 6M urea y 1 % β -mercaptoetanol. Las muestras se calentaron 3 minutos a 95 °C, luego se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm y se separó el sobrenadante. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de Acrilamida/Bisacrilamida preparados al 12% para phyB y PIF7 y al 10% para PIF4. Como anticuerpo primario se utilizó anti-HA policlonal de conejo (*Thermo Fisher* número de catálogo PA1-985) y anti-GFP policlonal de conejo (*Thermo Fisher* número de catálogo A-11122); y como anticuerpo secundario el anti-conejo IgG (H+L) con HRP (*Thermo Fisher* número de catálogo 31460). Para la detección se utilizó el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) y se reveló con placas radiográficas. Se empleó la tinción con rojo Ponceau como control de uniformidad de carga. Para la cuantificación de las bandas se utilizó el programa Fiji, siempre se seleccionó el mismo tamaño de rectángulo, con el que se midió la intensidad de cada una de las bandas. A la intensidad de cada banda de proteína se le restó la intensidad de banda del Ponceau para calcular su abundancia relativa.

Medición por RT-PCR de la expresión de PIF7

Plantas de Col-o fueron crecidas en placas 3 cm x 4 cm x 2 cm (largo-ancho-alto) horizontalmente durante tres días en las condiciones de crecimiento descriptas y al cuarto día fueron transferidas a tratamientos de temperatura. Luego de 4 horas de tratamiento fueron cosechadas y congeladas en nitrógeno líquido. Se extrajo ARN total utilizando reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. 1 μ g de ARN fue tratado con *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) y sujeto a una retrotranscripción por *Superscript II Reverse Transcriptase* (SSII RT) (*Thermo Fisher Scientific*) y oligo-dT, de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante. Los ADNc resultantes fueron luego amplificados utilizando un ciclador Mx3000P Real

Time PCR System (Agilent Technologies). El transcripto del gen *UBQ2* (AT2G36170) fue utilizado como referencia. El análisis de RT-PCR cuantitativa fue realizado mediante el método de curva estándar (Agilent Technologies, 2012).

La secuencia del *primer forward* fue: CGGAGCTTGAAGACAGCTAGAACC y la del *primer reverse*: GACTCGTTGTGAATCGCTGCTG.

Medición colorimetría de auxinas

Se siguió el protocolo descrito en Manna *et al.*, (2024). Plantas de Col-o tratadas durante 4 horas a distintas temperaturas fueron cosechadas, pesadas y luego congeladas en nitrógeno líquido. Las muestras se molieron con morteros hasta conseguir un polvo muy fino y se agregó 1 ml de etanol absoluto. Se mezcló en círculos continuamente para lograr la dilución de IAA y se colocó el líquido en un tubo *ependorff* para centrifugar a 1000 g por 10 minutos. Se agregaron 100 µl del sobrenadante a 900 µl del agente colorimétrico (mezcla de agua:ácido sulfúrico concentrado: 0,5 M FeCl₃ (25:15:0,75) en placas transparentes de 90 wells y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, al cabo del cual se midió la absorbancia a 540 nm en el equipo Varioskan LUX (*Thermo Scientific*). Para calcular la concentración de IAA se realizó una curva de calibración en el rango 0.49 - 501.76 mg/l. Usando la curva de calibración y el peso de cada muestra se calculó la concentración de IAA por peso fresco.

Experimentos en células de mamífero

Para estos experimentos se utilizó el vector *pSV40:phyB-GFP*, *pSV40:PIF4*, *pSV40:PIF7* realizados con el método de clonación Aqua (Beyer *et al.*, 2015) con el vector donador *pSV40-GFP* (al cual se le mantuvo el GFP o no, según el caso), y el vector *pSV40:PIF3-mCerulean*, provisto por el laboratorio del Dr. Matías Zurbriggen.

Las células de ovario de hámster chino (CHO-K1) se cultivaron en un medio F12 de HAM con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina. 24 h antes de la transfección, se sembraron 50.000 células en 500 ml de medio por pocillo sobre cubreobjetos de microscopio en placas de 24 pocillos. Se diluyeron 0.75 µg de ADN en 50 µl de OptiMEM por pocillo y se mezclaron con una mezcla de PEI/OptiMEM [2,5 µl de solución de PEI (1 mg/ml) en 50 µl de OptiMEM por pocillo] (Blomeier *et al.*, 2021). Se añadieron 100 µl de mezcla de transfección a cada pocillo gota a gota. El medio se intercambió después de 4 horas

para reducir la citotoxicidad. Luego de 24 h de la transfección, se incorporó el cromóforo PCB (15 μ M) (Beyer *et al.*, 2015) y se esperó 1 hora para comenzar a hacer los tratamientos de luz y temperatura que se describen en cada figura. Las células se fijaron en oscuridad con 200 μ l de PFA 4 % incubando por 10 minutos en hielo y 10 minutos a temperatura ambiente, lavando antes y después del PFA con 500 μ l de PBS. Luego se prepararon las muestras con 200 μ l de DAPI 0,1 % incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego las muestras se pegaron con 8 μ l Mowiol/DABCO en el portaobjetos de microscopio.

Puesta a punto de experimentos en células de mamífero

Como phyB es sintetizado en su forma Pr, las células transfectadas con phyB-GFP fueron iluminadas con luz roja durante 1 hora a 37 °C (temperatura fisiológica de las células de mamífero) para que su conformación cambie hacia Pfr y migre hacia el núcleo. Sin embargo, luego de fijar células en esas condiciones no fue posible visualizar condensados phyB y por lo tanto no fue posible inferir su actividad.

Para probar estrategias que permitieran ver condensados de phyB, se coexpresó phyB-GFP con PIF3, PIF4 y PIF7 individualmente. Se utilizaron los PIFs porque los condensados están formados por moléculas de phyB y también de otros componentes que interactúan con phyB como PIF3, PIF4 y PIF7, entre muchos otros (Kim *et al.*, 2023). Además, un trabajo del grupo del Dr. Matías Zurbriggen analiza condensados de phyB cuando es coexpresado con PIF3 (Beyer *et al.*, 2015). La coexpresión de phyB con los PIFs permitió en todos los casos visualizar condensados, aunque el agregado de PIF4 y PIF7 no presentó diferencias significativas y la formación fue mucho más definida cuando phyB fue coexpresado con PIF3. Incluso, se observó que PIF3 y phyB colocalizan. Basados en estos resultados, los experimentos se realizaron coexpresado phyB con PIF3 en igual concentración.

Análisis estadístico de los datos originales

Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ error estándar (EE). El análisis estadístico se realizó en el programa *GraphPad Prism* y en R. En los datos donde se observa una tendencia lineal clara entre más de dos puntos, se calculó la regresión lineal simple entre las pendientes (ascendente o descendente, según corresponda). En los datos donde no, se realizó un ANOVA de 1 factor con la temperatura como factor seguido de la prueba Dunnet o Holm-Šidák para comparar medias contra un control o realizar múltiples comparaciones entre sí,

respectivamente. En los casos donde sólo se buscó comparar medias se usó una prueba de t. En algunos casos fue necesario realizar una comparación entre más de un tratamiento en simultáneo, usando ANOVA de dos factores seguido por comparaciones múltiples con la prueba de Tukey. Y, en los experimentos con muchas variables se realizó un análisis de regresión lineal múltiple *stepwise* analizando los efectos simples y las interacciones de las variables. La significancia se señala con asteriscos y corresponden al $p > 0,05$ (ns, no significativo), $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****). En los casos donde son muchas comparaciones se señalan las diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con letras.

Análisis de supervivencia de plántulas

Las plantas de Col-o y de *phyB-9*, *elf3-1*, *elf3-4*, *elf3-8*, *elf3-9*, *pif7-1* y *pif7-2* se sembraron sobre placas de Petri con agar/agua al 1 %. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que las ya descritas. Una hora después del comienzo del día 4, se colocaron las placas a 37 °C durante 8 horas y luego se regresaron a 22 °C durante 24 horas para recuperación. Al cabo de ese tiempo, se tomaron fotografías de las placas y se calculó la proporción de supervivencia, considerando plantas muertas aquellas sin clorofila en sus cotiledones. Como control negativo, un grupo de placas permaneció constante a 22 °C.

Ensayos de tinción con NBT

Para la detección histoquímica de $O_2^{\cdot-}$ las plántulas se tiñeron con NBT al 0.1 % (p/v) diluido en solución de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,5) conteniendo 10 mM de NaN_3 , durante 1 hora. La reacción se detuvo poniendo las plántulas en etanol al 96 % durante la noche, lo que también las aclara. La presencia de $O_2^{\cdot-}$ se evidenció por la formación de un precipitado azul oscuro producto de la reducción del NBT. Las plántulas se fotografiaron con una lupa y se midió la intensidad promedio (en pixeles) de los cotiledones teñidos. Los resultados se normalizaron a Col-o en 10 °C.

Resultados

Capítulo

1

Meta-análisis del transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a la temperatura



Impacto de la temperatura en el transcriptoma

La temperatura actúa como una señal ambiental fundamental que ejerce una profunda influencia en la morfología de las plantas. En *Arabidopsis thaliana* este efecto se estudia comúnmente comparando una temperatura específica con un control estándar, que generalmente se establece alrededor de 22 °C y se ignora en gran medida la forma de las respuestas a todo el rango de temperatura que afecta el crecimiento (Zhu *et al.*, 2022). Con el objetivo de realizar un análisis comparativo del transcriptoma que permita estudiar en conjunto la respuesta a diferentes temperaturas, se realizó un meta-análisis con datos disponibles en el dominio público correspondientes a plantas de *Arabidopsis* crecidas en temperatura templada (20 °C - 23 °C) y luego transferidas a temperatura fría, cálida o muy alta. Se agruparon los genes que cambian su expresión con la temperatura de manera estadísticamente significativa en cuatro grupos, según la temperatura de máxima expresión. El impacto general de la temperatura sobre el transcriptoma se muestra en la **Figura 1.1**.

Para este análisis se establecieron criterios experimentales específicos para la selección de los datos. Como en todo metaanálisis, es necesario encontrar un equilibrio: si los criterios de inclusión son demasiado estrictos, el análisis se limita a pocos datos; si son demasiado flexibles, la inclusión de experimentos con condiciones muy distintas puede diluir las tendencias generales. Aun considerando esta inevitable variabilidad, se identificaron casi 11.000 genes que muestran una respuesta robusta a la temperatura (**Figura 1.1**). Los grupos más numerosos corresponden a genes que presentan una expresión máxima en los extremos térmicos. En muchos de estos casos, el mínimo de expresión no se encuentra necesariamente en el extremo opuesto, lo que sugiere que ciertos genes tienden a activarse ante temperaturas extremas —altas o bajas—, aunque no de forma simétrica. Estos resultados reflejan tendencias claras y consistentes, respaldadas por una amplia base de datos.

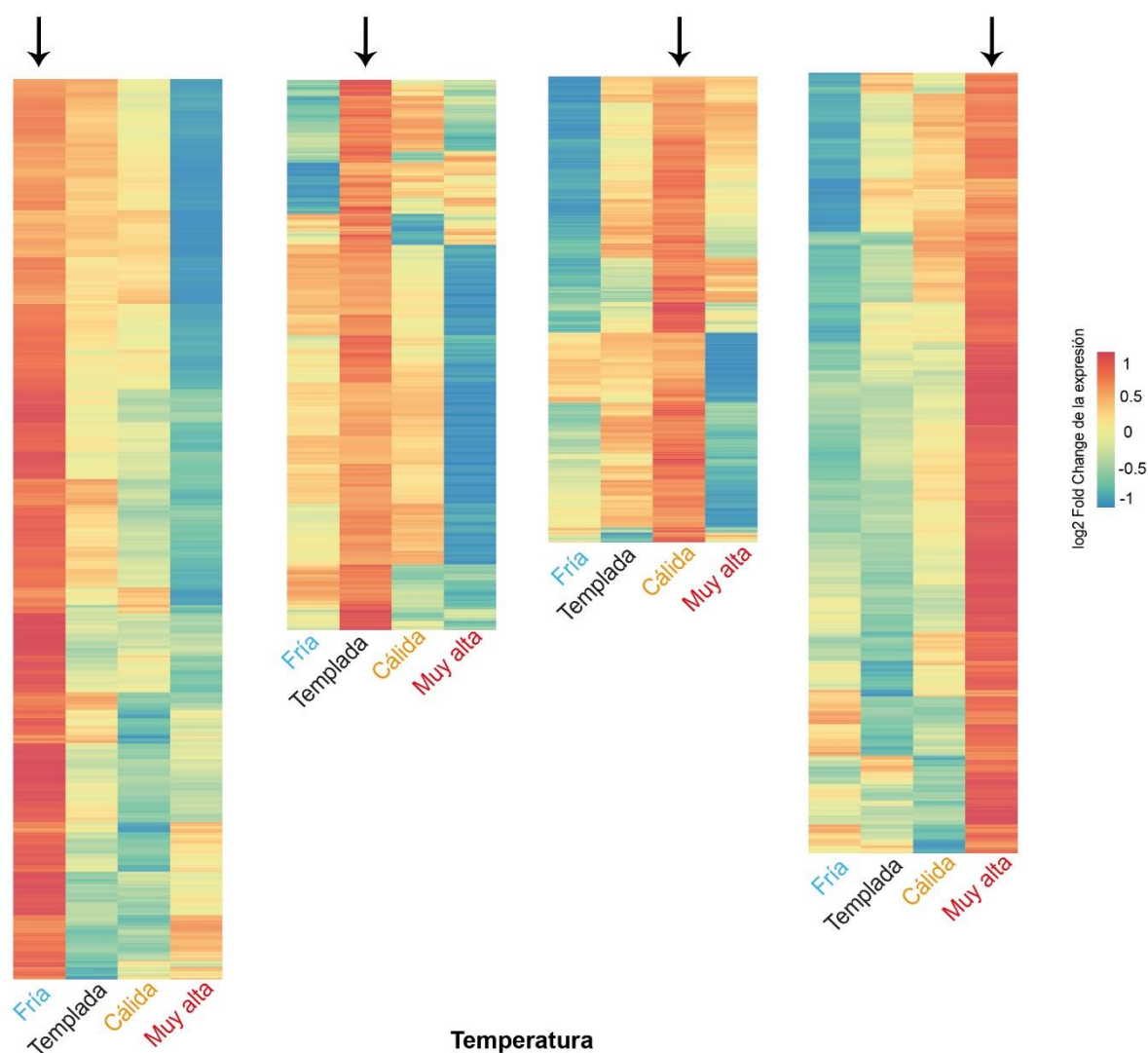


Figura 1.1. La temperatura afecta el transcriptoma de *Arabidopsis thaliana*. Meta-análisis de la temperatura en plantas crecidas en temperatura templada y transferidas a temperatura fría, alta o muy alta. Los genes diferencialmente expresados se agrupan según la temperatura de máxima expresión (marcada por las flechas). Los colores representan el logaritmo en base 2 de la expresión.

Para caracterizar los procesos biológicos que responden a la temperatura, se analizaron los términos ontológicos significativamente sobrerrepresentados en cada grupo. En la **Figura 1.2** se muestran las categorías más relevantes (la lista completa se encuentra publicada en Casal *et al.*, 2024).

En el grupo de genes con máxima expresión en temperaturas frías resaltan los términos de “aclimatación al frío”, “biogénesis de subunidades pequeñas del ribosoma”, “regulación del desarrollo de hojas”, “división celular”, “transporte de

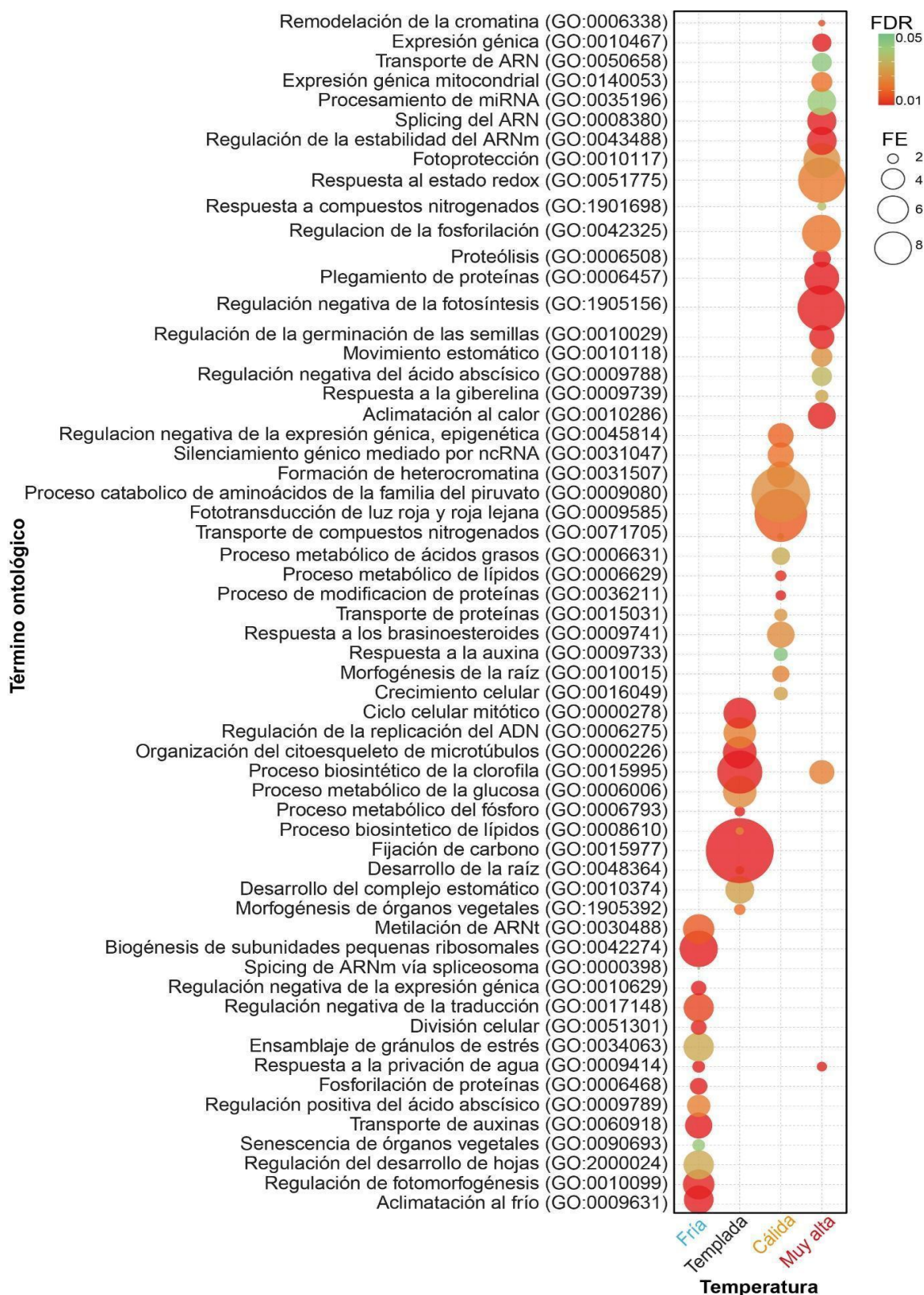


Figura 1.2. Términos ontológicos correspondientes a procesos biológicos sobrerrepresentados en los genes que responden a la temperatura, agrupados de acuerdo con la temperatura de máxima expresión. La escala de color del rojo al verde indica la significancia basada en el análisis estadístico de Fisher (FDR, *False Discovery Rate*). El tamaño de las burbujas indica el grado de sobrerrepresentación (FE).

auxinas” y “regulación positiva del ácido abscísico”. En el grupo con máxima expresión en temperaturas templadas resaltan los términos “fijación de carbono”, “ciclo celular mitótico”, “proceso biosintético de la clorofila”, “morfogénesis de órganos vegetales” y “regulación de la replicación del ADN”. En el grupo de genes con máxima expresión en temperaturas cálidas se destacan los términos “formación de la heterocromatina”, “crecimiento celular”, “transporte de proteínas”, “respuesta a auxinas”, “respuesta a los brasinoesteroides”. Por último, en el grupo de genes con máxima expresión en temperaturas muy altas se destacan los términos ontológicos “aclimatación al calor”, “plegamiento de proteínas”, “proteólisis”, “remodelación de la cromatina”, “fotoprotección”, “respuesta al estado redox”, “regulación negativa del ácido abscísico” y “respuesta a la giberelina”.

En palabras simples, los desafíos que presentan las distintas temperaturas regulan la actividad de grupos de genes específicos.

Caracterización de la expresión de los genes vinculados a la acción de la auxina en respuesta a la temperatura

Entre los términos ontológicos que cambiaron significativamente con la temperatura, se identificaron varios relacionados con hormonas como auxinas, brasinoesteroides, giberelinas y ácido abscísico (**Figura 1.2**). Para varias de estas hormonas hay literatura extendida que describe su participación en la regulación del crecimiento bajo diferentes condiciones térmicas (Jeong & Kim, 2013; Quint *et al.*, 2023; Richter *et al.*, 2010). Dado el rol positivo de las auxinas en la promoción del crecimiento del hipocotilo a temperaturas cálidas, se decidió explorar en detalle la respuesta de genes funcionalmente vinculados a su acción a lo largo de todo el rango de temperaturas. El papel central de las auxinas en este contexto se debe al aumento en sus niveles, lo cual promueve la elongación del hipocotilo mediante la acidificación del apoplasto (Lin *et al.*, 2021; Fendrych *et al.*, 2016). En contraste, a temperaturas muy altas el crecimiento se inhibe (Legris *et al.*, 2014; Parent & Tardieu, 2012), aunque se desconoce si las auxinas están involucradas en este efecto.

Con el objetivo de cuantificar la respuesta del crecimiento en un amplio rango de temperaturas, se caracterizó la tasa de crecimiento del hipocotilo en plantas de *A. thaliana* (**Figura 1.3**). Esta variable se empleará como parámetro comparativo en los análisis posteriores con distintos genotipos.

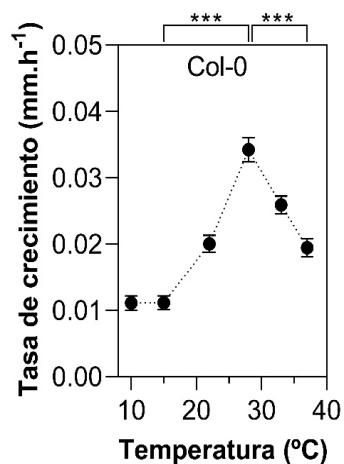


Figura 1.3. Temperaturas cálidas promueven y temperaturas altas inhiben el crecimiento del hipocotilo de las plantas. Tasa de crecimiento del hipocotilo en plantas de genotipo salvaje (Col-0) tratadas durante 9 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de doce réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes.

De forma consistente con lo mencionado en la literatura, los resultados muestran que la temperatura aumentó la tasa de crecimiento del hipocotilo entre 15 °C - 28 °C, y la disminuyó entre 28 °C - 37 °C. Además, mientras que temperaturas cálidas favorecieron la elongación, las temperaturas frías y muy altas inhibieron el crecimiento del hipocotilo (**Figura 1.3**).

Dado que la promoción del crecimiento está regulada por el aumento de las auxinas, una pregunta interesante es: ¿la inhibición del crecimiento en temperaturas muy altas ocurre por regulación de las auxinas? Aunque no se conocen los niveles de auxinas producidas en otras temperaturas más que las cálidas, se sabe que cantidades excesivas de auxinas conducen a una acidificación extrema del apoplasto, generando el efecto inhibitorio de la elongación del hipocotilo (Wang *et al.*, 2024). Por lo tanto, se desprenden dos hipótesis posibles que podrían explicar la reducción de la elongación del hipocotilo. La hipótesis nula, según la cual las temperaturas muy altas incrementan la acidificación por el aumento en la cantidad de auxinas, o, alternativamente, las reducen.

Para explorar explicaciones que ayuden a discernir entre las dos hipótesis posibles, se seleccionaron de la **Figura 1.2** los términos ontológicos relacionados a las auxinas —“transporte de auxinas” y “respuesta a auxinas” —, que figuran en grupos

con máxima expresión en temperatura fría y cálida respectivamente, y se graficó la expresión de los genes en función de la temperatura (**Figura 1.3**).

En temperaturas muy altas disminuyó la expresión de los genes de ambos términos, sugiriendo una convergencia en la regulación de la expresión de genes con distinta función en la vía de las auxinas. En temperaturas cálidas se observó el

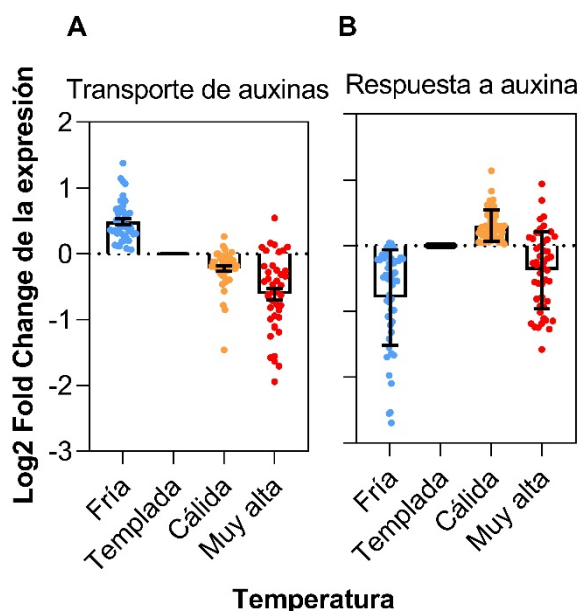


Figura 1.3. La temperatura muy alta disminuye la expresión de genes relacionados al transporte y respuesta a las auxinas. Genes diferencialmente expresados en respuesta a la temperatura de los términos ontológicos “transporte de auxinas” del grupo de genes con máxima expresión en temperatura fría (**A**), y “respuesta a auxinas” del grupo con máxima expresión en temperatura alta (**B**). Cada punto corresponde a la expresión de un gen y las barras grafican el promedio $\pm$ EE.

aumento de la expresión en los genes pertenecientes al término “respuesta a auxina” y la disminución en los genes agrupados en “transporte de auxinas”, que es un escenario novedoso porque indica que las temperaturas cálidas no generan de manera uniforme el aumento en la expresión en todos los genes involucrados en las auxinas.

Para profundizar en el análisis, se tomaron del meta-análisis la expresión de todos los genes que cambiaron significativamente con la temperatura y que estuvieran involucrados en la ruta de las auxinas. Para ello, se utilizó una lista de genes asociados a la biosíntesis, metabolismo, transporte, percepción y señalización de las auxinas (Iglesias *et al.*, 2018, Bianchimano – De Luca *et al.*, 2024). Los genes identificados fueron representados en un *heatmap* en función de la temperatura (**Figura 1.4**).

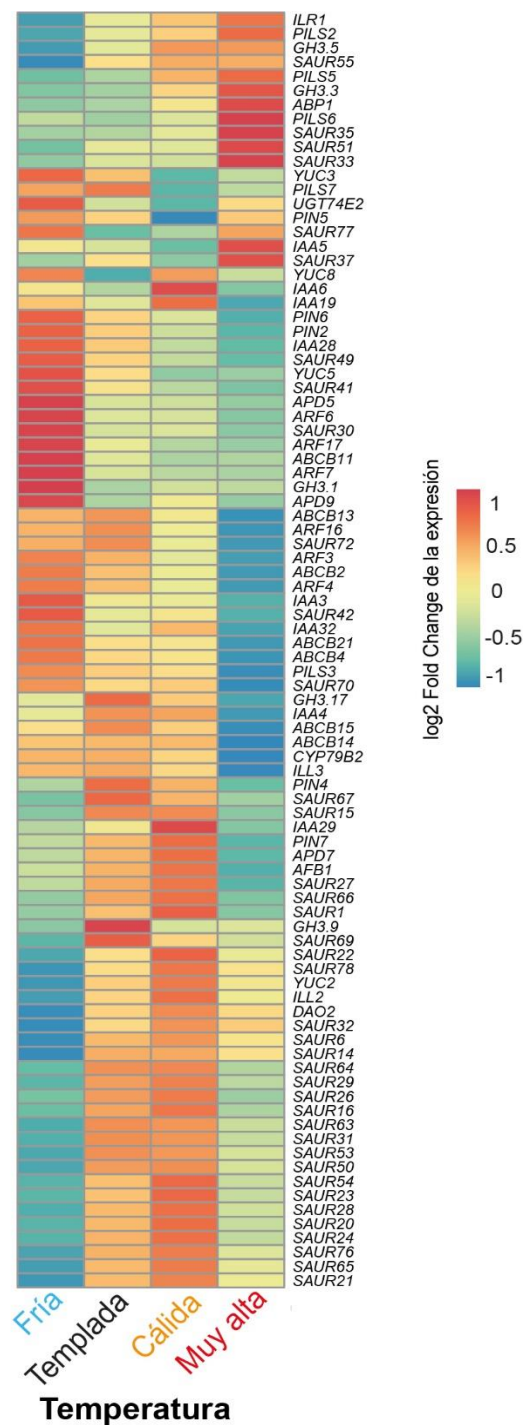


Figura 1. 4. La expresión de los genes relacionados a la síntesis, percepción y señalización de auxinas disminuye en temperatura muy alta. Expresión (log2 Fold Change) de los genes relacionados a auxinas del meta-análisis.

De los 229 genes relacionados con la auxina incluidos en la lista original, 90 mostraron efectos significativos de la temperatura y corresponden a la síntesis, percepción o señalización de la hormona. Este análisis muestra un patrón muy claro y llamativo en temperaturas muy altas: una gran cantidad de genes (74 de los 90 significativos) disminuyeron su expresión indicando una generalidad en el impacto

que tienen temperaturas altas sobre los genes relacionados con las auxinas. Además, ningún gen de síntesis de auxinas tiene su máximo de expresión en temperaturas muy altas.

La información obtenida del meta-análisis es consistente con la hipótesis alternativa, según la cual la inhibición del crecimiento a temperaturas muy altas se debe a una disminución en los niveles de auxinas. En efecto, se observa una reducción en la expresión de genes relacionados con las auxinas, incluyendo aquellos involucrados en su biosíntesis, lo que podría afectar la cantidad de auxina producida por la planta.

Capítulo

2

**Las temperaturas muy altas revierten la
promoción de la vía de auxinas
estimulada por temperaturas cálidas**



Los niveles de auxinas disminuyen en temperaturas muy altas

Los resultados del meta-análisis del capítulo 1 muestran que el patrón de expresión de los genes de respuesta a auxinas disminuye en temperaturas muy altas, Para evaluar si las temperaturas muy altas efectivamente reducen los niveles de auxina se utilizaron dos metodologías diferentes. Por un lado, se utilizó un sensor que permite la cuantificación de auxinas mediante una reacción FRET en microscopía confocal y, por otro lado, se midió la concentración de IAA endógena usando un método colorimétrico (**Figura 2.1**).

El FRET del sensor de auxinas aumentó entre 15 °C - 28 °C y disminuyó entre 28 °C - 37 °C (**Figura 2.1.A**). La determinación colorimétrica de IAA mostró el mismo patrón (**Figura 2.1.B**). Estos resultados, basados en técnicas muy diferentes, indican que los niveles endógenos de auxina alcanzan un máximo a temperaturas cálidas para decaer a temperaturas muy altas. Estos datos son consistentes con la hipótesis alternativa que propone que la caída del crecimiento se debe a una caída en los niveles de auxina.

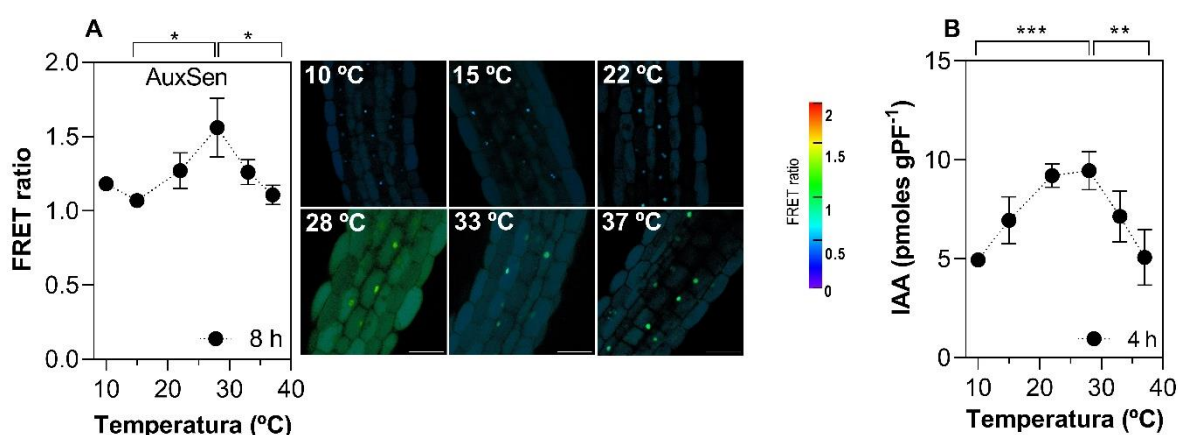


Figura 2.1. El reportero de auxina endógena y la medición de IAA por absorbancia disminuyen en temperaturas muy altas. Todas las plantas se midieron luego de 4 h de tratamiento de temperatura: 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Se grafica el sensor de auxinas medido por FRET calculada como el ratio entre las longitudes de onda registrada entre 454–491 nm y 525–562 nm en microscopía confocal (**A**) y niveles endógenos de IAA medido por absorbancia (**B**). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes.

La señalización por la vía de auxinas disminuye con temperaturas muy altas

Una consecuencia esperada de la caída de los niveles de auxina es que esto se vea manifestado en los pasos que se encuentran río abajo de la vía. Para caracterizarlos, se utilizó el reportero DII-VENUS, que mide la estabilidad de los correceptores Aux/IAAs que disminuyen su abundancia cuando hay más cantidad de auxinas (Brunoud *et al.*, 2012). En los resultados se observa que la fluorescencia de DII-VENUS disminuyó entre 22 °C - 28 °C y aumentó entre 33 °C - 37 °C (**Figura 2.2.A**). Por lo tanto, este resultado confirma que las temperaturas cálidas aumentan la cantidad de auxina, pero, lo que es más relevante para la pregunta planteada, es que son consistentes con la hipótesis que las temperaturas muy altas revierten este proceso.

La auxina estimula la actividad de los ARFs y por ese motivo se midió la fluorescencia generada por el reportero DR5-GFP, que mide la actividad transcripcional de los factores ARFs, la cual aumenta cuando hay más cantidad de auxina. En los resultados se observa que la fluorescencia de *DR5-GFP-NLS* aumentó entre 10°C - 28 °C y disminuyó entre 28 °C - 37 °C (**Figura 2.2.B**). El reportero DR5-GFP, sin señal de localización nuclear, muestra el mismo patrón (**Figura 2.2.C**). La caída en temperaturas muy altas es consistente con la hipótesis de que la reducción del crecimiento en esas condiciones es causada por la pérdida de la promoción observada en temperaturas cálidas.

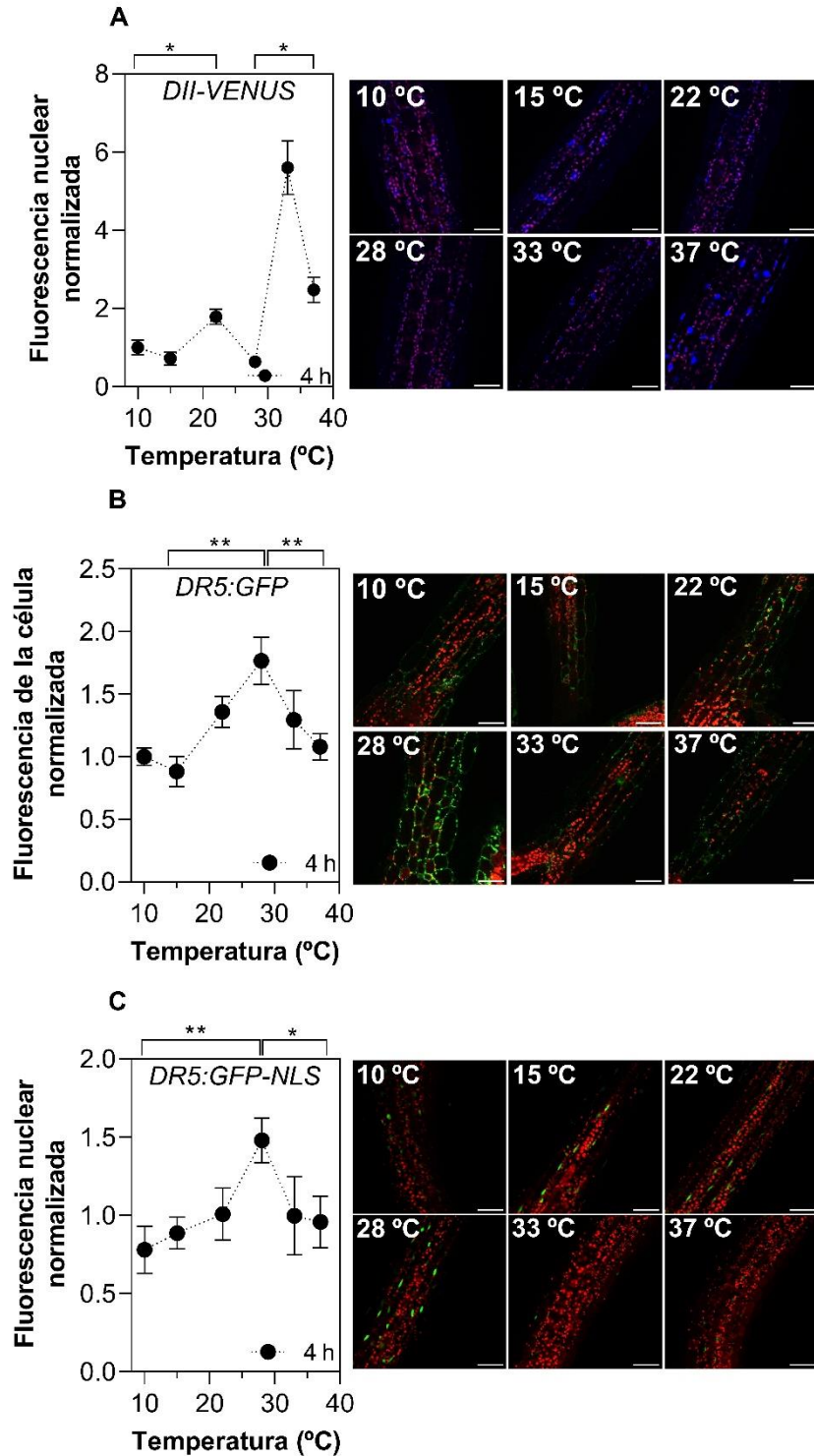


Figura 2.2. La fluorescencia nuclear de *DII-VENUS* aumenta mientras que la fluorescencia nuclear y celular de *DR5:GFP* disminuyen en temperaturas muy altas. Todas las plantas se midieron luego de 4 h de tratamiento de temperatura: 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Se grafica la de fluorescencia nuclear normalizada de *DII-VENUS* (A), la fluorescencia celular normalizada de *DR5:GFP* (B) y la nuclear de *DR5:GFP-NLS* (C) medidos por microscopía confocal. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes, excepto para *DR5:GFP-NLS* entre 28 °C y 37 °C donde se hizo ANOVA con comparaciones múltiples señaladas entre corchetes, mediante la prueba Holm-Šídák.

Los niveles nucleares de TIR1 y ARF6 disminuyen con temperaturas muy altas.

Los cambios observados en los niveles de auxina y la actividad de los reporteros DII-VENUS y DR5 son coherentes entre sí. Eso no elimina la posibilidad de que la temperatura tenga puntos de entrada adicionales al sistema. Para evaluar esta

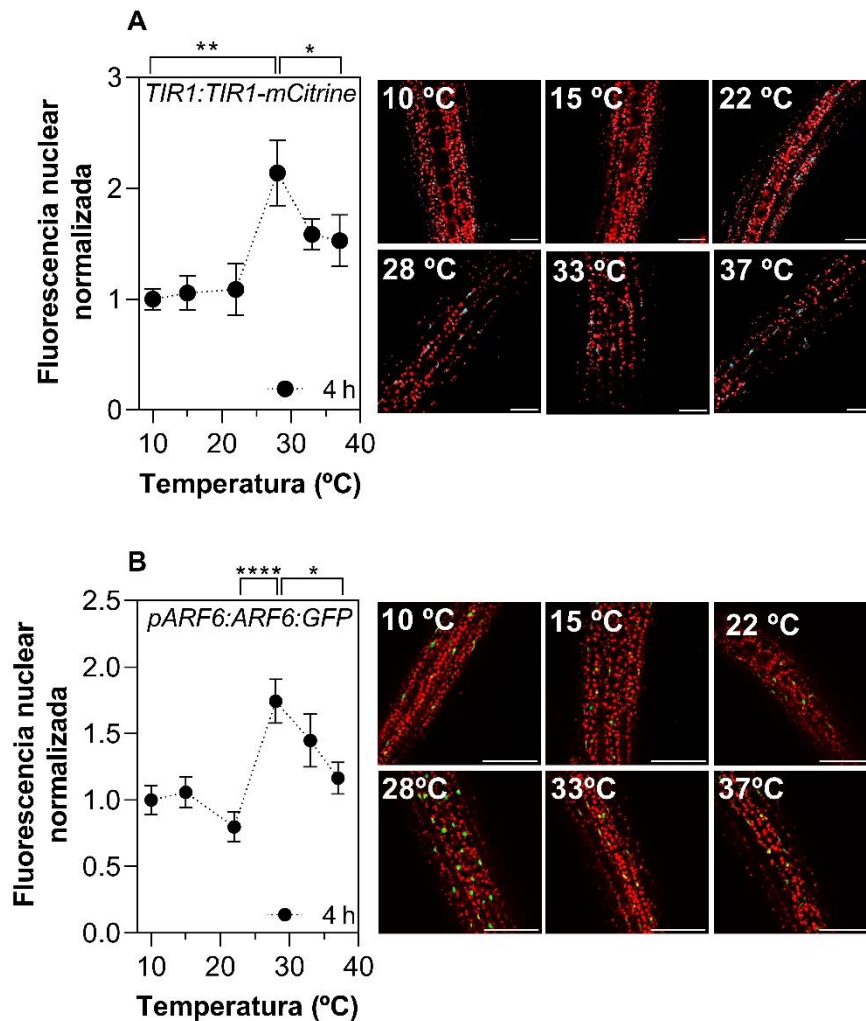


Figura 2.3. La fluorescencia nuclear de Tir-mCitrina y de ARF6-GFP disminuyen en temperaturas muy altas. Todas las plantas se midieron luego de 4 h de tratamiento de temperatura: 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Se grafica la de fluorescencia nuclear normalizada de *DR5:GFP* (A), *DR5:GFP-NLS* (B) y de *pARF6:ARF6:GFP* (D) medidos por microscopía confocal. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes, excepto para *DR5:GFP-NLS* entre 28 °C y 37 °C; y para *pARF6:ARF6:GFP* entre 10 °C y 28 °C donde se hizo ANOVA con comparaciones múltiples señaladas entre corchetes, mediante la prueba Holm-Šidák.

posibilidad, se midió la abundancia del receptor nuclear de auxinas, TIR1, usando el reportero TIR1-mCitrine (**Figura 2.3.A**).

Se observó que la fluorescencia nuclear de TIR1-mCitrine aumentó entre 10°C - 28 °C (resultado que es consistente con lo observado en trabajos previos, Salehin *et al.*, 2019) y disminuyó entre 28 °C - 37 °C (**Figura 2.3.A**). Esto indica que las temperaturas cálidas aumentan la cantidad nuclear del receptor, mientras que temperaturas muy altas la disminuyen. Además, se utilizó un reportero de ARF6 y se observó un aumento de la fluorescencia entre 22 °C - 28 °C y la disminución entre 28 °C - 37 °C (**Figura 2.3.B**).

En conjunto, los resultados indican que las temperaturas cálidas no sólo aumentan la cantidad de auxina, sino que también aumentan las abundancias nucleares del receptor TIR1 y de ARF6. En cambio, temperaturas muy altas disminuyen la cantidad de auxina y las abundancias nucleares de TIR1 y ARF6.

Temperaturas muy altas causan la alcalinización del apoplasto de las células del hipocótilo

La promoción de la expansión celular que induce auxina ocurre a través de la acidificación del apoplasto y niveles supra-óptimos de auxina, que inhiben el crecimiento, causan el efecto opuesto (Wang *et al.*, 2024). Para evaluar el grado de acidificación del apoplasto, se utilizó un medidor del pH del apoplasto para evaluar los efectos de la temperatura (**Figura 2.4**).

Se observa que la fluorescencia del apoplasto de Apo-pHluorin aumentó en temperaturas muy altas, lo que indica que la acidificación disminuye (se hace más alcalino), aunque no se observa el aumento de la acidificación esperada en temperaturas cálidas respecto a temperaturas templadas (**Figura 2.4**). La disminución en la acidificación del apoplasto aporta evidencias para rechazar la hipótesis nula, ya que propone que un aumento en la acidificación explicaría la disminución del crecimiento y los resultados obtenidos indican lo contrario.

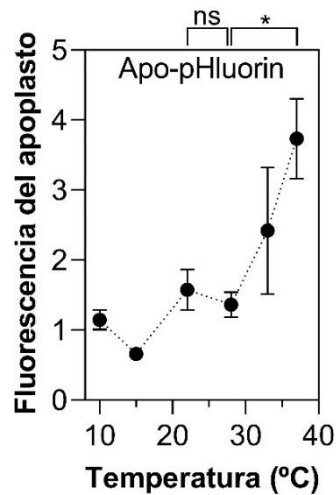


Figura 2.4. La fluorescencia del apoplasto disminuye en temperaturas muy altas. Las plantas se midieron luego de 4 h de tratamiento de temperatura: 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Se grafica la fluorescencia de *Apo-pHluorin* del apoplasto en células del hipocotilo, calculada como el ratio entre las longitudes de onda 390 nm y 470 nm medidos por microscopía confocal. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Análisis estadístico entre 10 °C y 28 °C corresponde a un ANOVA con comparaciones múltiples señaladas entre corchetes, mediante la prueba Holm-Šidák, y entre 28 °C y 37 °C a una regresión lineal.

La caída del crecimiento causadas por temperaturas muy altas se pierde en mutantes de síntesis de auxina o de respuesta a auxina

En el genotipo salvaje, el patrón de crecimiento del hipocotilo en respuesta a la temperatura (**Figura 1.3**) correlaciona con el de los niveles endógenos de auxinas (**Figura 2.1**) y el estado de activación de su vía de señalización (**Figura 2.3**). Si la caída del crecimiento en temperaturas muy altas fuese causada por una reducción de los niveles de auxina, plantas mutantes en genes de síntesis o de respuesta a auxina deberían evidenciar una caída menos marcada del crecimiento.

Efectivamente, se observó que las plantas mutantes de los genes de síntesis de auxinas, *sav3* y *yucQ*, y las plantas mutantes *saur*, (los genes *SAUR* son activados por los ARFs y forman parte de la respuesta temprana a auxina que causa la promoción del crecimiento), no mostraron inhibición del crecimiento entre 28°C - 37 °C, al contrario de las plantas de genotipo salvaje (**Figura 2.5**). Como era de esperarse, estos mutantes tampoco mostraron la promoción entre 22°C - 28°C, manteniendo relativamente constante su tasa de crecimiento entre 22 °C - 37 °C (**Figura 2.5**). Sin

embargo, la falta de promoción a 28 °C no es la causa indirecta de la falta de inhibición porque el nivel de crecimiento en los mutantes a 37 °C es suficiente como para haber detectado una caída, de haber existido.

El meta-análisis del transcriptoma mostró que la expresión de los genes de respuesta a auxina disminuye en temperaturas muy altas. A partir de los resultados de

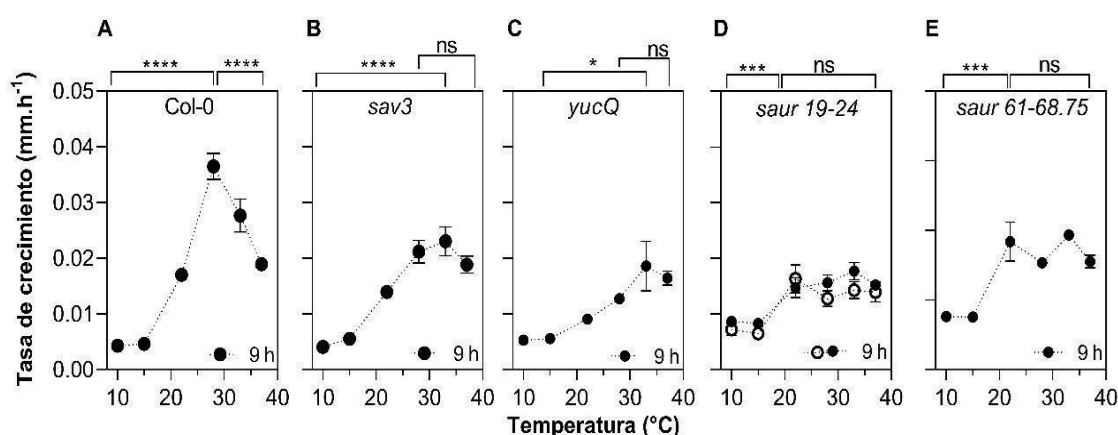


Figura 2.5. Plantas mutantes de auxinas no responden correctamente a las temperaturas.

Tasa de crecimiento del hipocotilo de plantas de genotipo salvaje (Col-0) repetidos de la figura 2.2, para mejor comparación con la mutante (A), *sav3* (B), *yucQ* (C) y *saur 19-24* (D) y *saur 61-68.75* (E), tratadas durante 9 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio ± EE de doce réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. El análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes, excepto en *sav3* y *yucQ* que se hizo ANOVA entre 28 °C y 37 °C y para los *saur* entre 22 °C y 37 °C, seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák.

este capítulo se puede concluir que los niveles de auxina y la activación de la vía transcripcional de auxina efectivamente caen a temperaturas muy altas. La evidencia genética es consistente con que dicha caída sea una causa importante de la inhibición del crecimiento.

Capítulo

3

**El módulo phyB-PIF4 regula la
inhibición del crecimiento en
temperaturas muy altas**



Los resultados del capítulo 2 muestran que el contenido de auxinas aumenta a temperaturas cálidas, pero disminuye a temperaturas muy altas. El termosensor phyB percibe el aumento de temperatura disminuyendo su actividad, lo que permite que los PIFs activen los genes de síntesis de auxinas. Dado que en temperaturas muy altas la auxina disminuye, es posible que los componentes río arriba también reviertan su acción. Para evaluar esta posibilidad, en este capítulo se analiza el papel de phyB y los componentes de señalización que actúan río abajo.

El impacto inhibitorio de phyB aumenta en temperaturas muy altas y la respuesta se traslada río abajo

Para explorar cuantitativamente la participación del phyB en la regulación del crecimiento en temperaturas más altas, se compararon plantas de genotipo salvaje (Col-o) y mutantes nulas *phyb*. Como era de esperarse (Casal *et al.*, 2024), la mutante *phyb* presentó tasas de crecimiento más elevadas que plantas salvajes en el rango de temperaturas templadas, cálidas y muy altas (**Figura 3.1**, nótese la diferencia de escala). Las plantas salvajes y las plantas *phyb* presentaron la misma temperatura de transición de promoción a inhibición del hipocotilo (28 °C). La tasa de crecimiento de las plantas Col-o, se puede expresar como la tasa de crecimiento máxima dividida la inhibición provocada por phyB y la inhibición causada por otros factores. En cambio, la tasa de crecimiento del mutante *phyb* se puede expresar como la tasa de crecimiento máxima dividida la inhibición causada por otros factores. Teniendo las tasa de crecimiento de ambos genotipos y conociendo la tasa de crecimiento potencial es posible calcular el efecto inhibitorio de *PHYB* a partir de un sistema de dos ecuaciones (algo similar se realizó en otros trabajos del grupo, Legris *et al.*, 2016, Romero-Montepaone *et al.*, 2021).

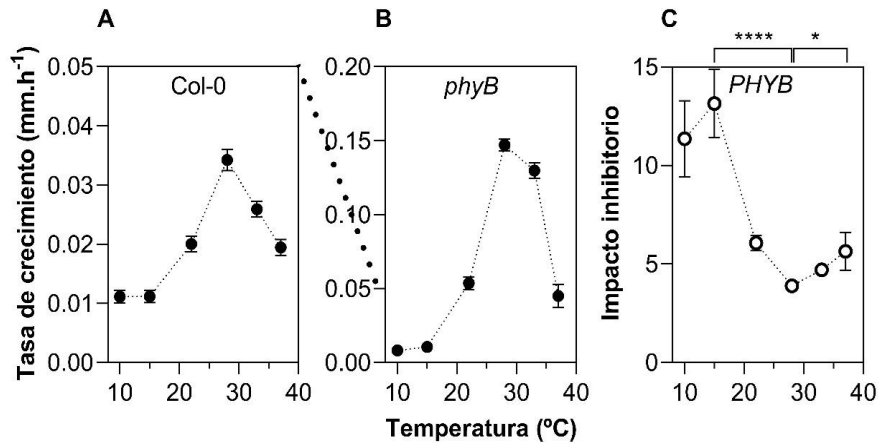


Figura 3.1. El impacto inhibitorio de PHYB aumenta en temperaturas supra óptimas. Tasa de crecimiento del hipocotilo de plantas de genotipo salvaje (Col-0) repetidos de la figura 2.2, para mejor comparación con la mutante (A), *phyB* (B) tratadas durante 9 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C; impacto inhibitorio de *PHYB* calculado a partir de los datos de crecimiento del hipocotilo de las plantas mutantes con respecto a plantas Col-0 (C). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de doce réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo sobre el cálculo del efecto inhibitorio y corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes.

El impacto inhibitorio de *PHYB* disminuyó entre 15 - 28 °C, pero aumentó entre 28 - 37 °C (**Figura 3.1.A**). Esto sugiere que *phyB* recupera su función inhibitoria en temperaturas muy altas.

Para ampliar el análisis hacia los componentes de la vía de señalización que controla *phyB* (**Figura 1**), se calculó el impacto promotor o inhibitorio de los genes (según la naturaleza del gen) utilizando los datos de tasa de crecimiento en cada temperatura (**Figura 3.2**).

En todos los casos se observó que las plantas mutantes muestran la transición de temperaturas promotoras a inhibitorias a 28 °C (**Figura 3.2**). Sin embargo, en plantas mutantes de la síntesis de ácido abscísico se observó la temperatura de transición en 33 °C (**Figura 3.3**), lo que demuestra que es posible cambiar la transición térmica y que el ácido abscísico es clave en ese proceso.

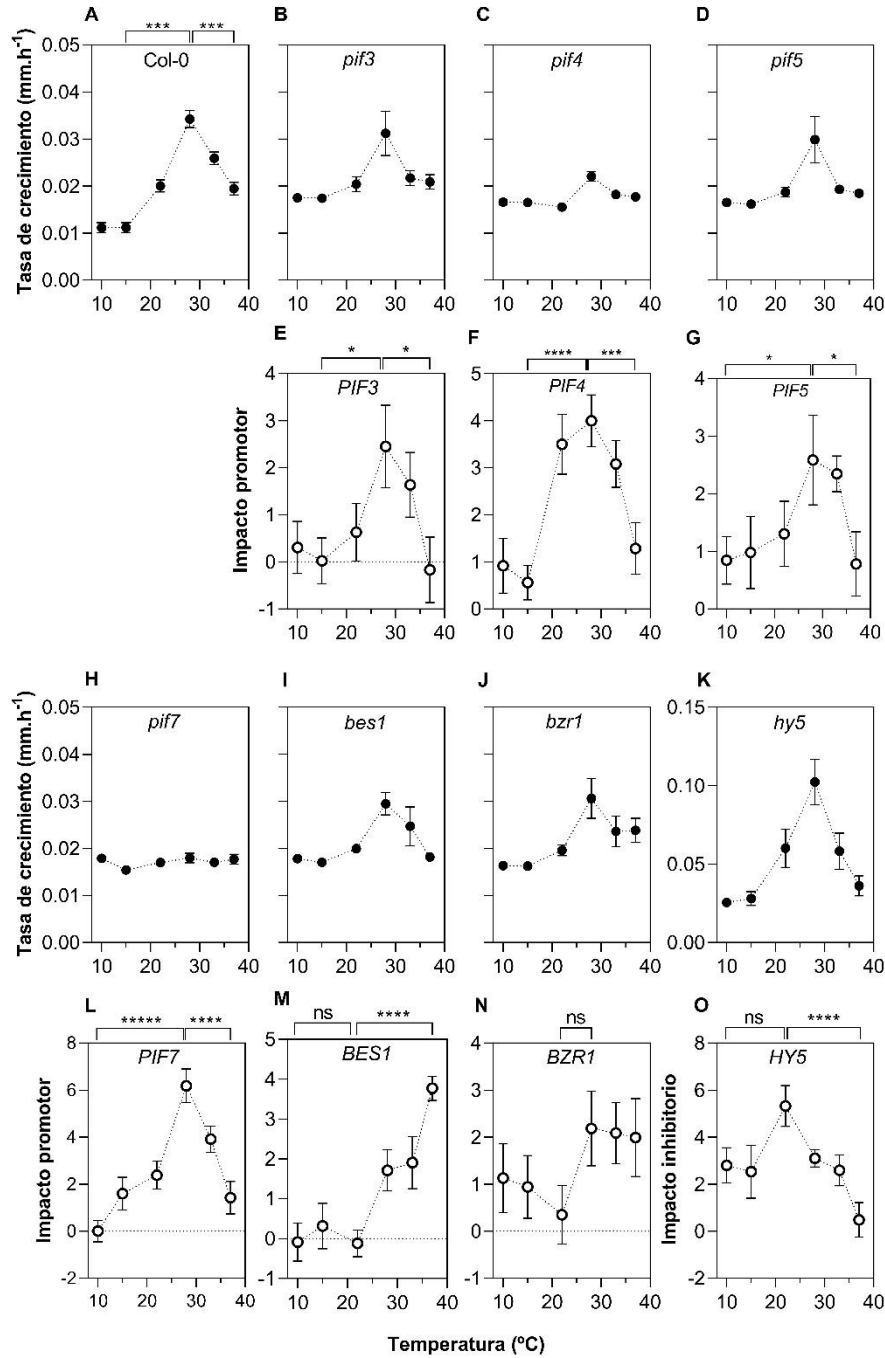


Figura 3.2. El efecto promotor de *PIF4*, *PIF3*, *PIF5* y *PIF7* decae en temperaturas muy altas, pero no así los de *BES1* y *BZR1*. Tasa de crecimiento del hipocotilo de plantas de genotipo salvaje (Col-o) (A), repetidos de la figura 2.2, para mejor comparación con las plantas mutantes de la vía de termomorfogénesis *pif3* (B), *pif4* (C), *pif5* (D), *pif7* (H), *bes1* (I) y *bzt1* (J), *hy5* (K), tratadas durante 9 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Impacto promotor de cada gen calculado a partir de los datos de crecimiento del hipocotilo de las plantas mutantes con respecto a plantas Col-o (es el efecto inhibitorio cambiado de signo cuando el efecto inhibitorio resulta negativo), *PIF3* (E), *PIF4* (F), *PIF5* (G), *PIF7* (L), *BES1* (M), *BZR1* (N), y el impacto inhibitorio de *HY5* (O). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de doce réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo sobre el cálculo del efecto de los genes y corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes, excepto para *BES1* entre 10°C y 22°C, *BZR1* en todo el rango y *HY5* entre 10 °C y 22 °C, donde se realizó un ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák

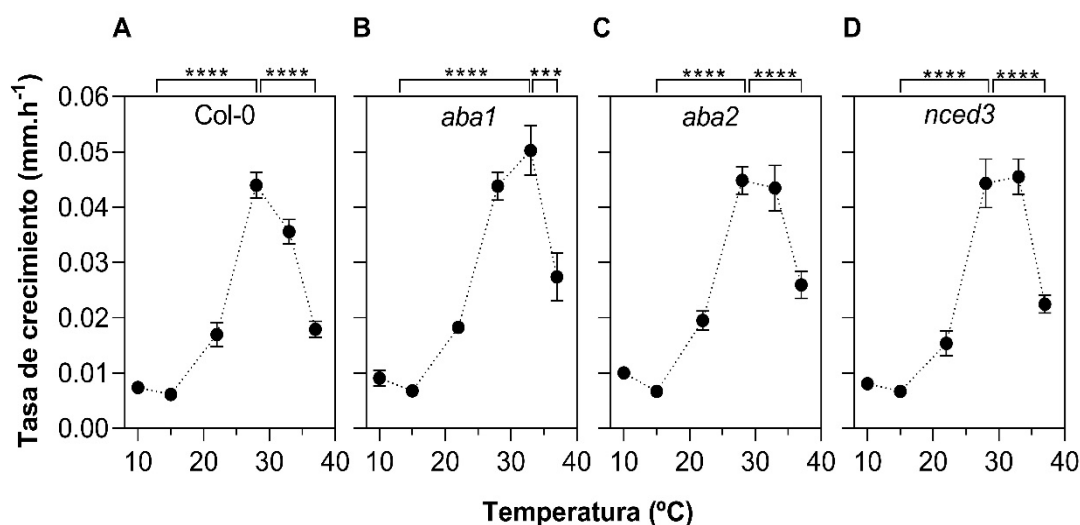


Figura 3.3. Las mutantes de síntesis de ácido abscísico cambian la temperatura en la cual ocurre la transición entre promoción e inhibición del crecimiento. Tasa de crecimiento del hipocotilo de plantas de genotipo salvaje (Col-0) (A) y de mutantes de la vía de síntesis de ácido abscísico *aba1* (B), *aba2* (C) y *nced3* (D), tratadas durante 9 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de doce réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. El análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes, excepto en *aba1*, *aba2* y *nced3* donde se realizó un ANOVA entre 28 °C y 37 °C seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák.

Volviendo a los resultados obtenidos de los genes que modifican su actividad directa o indirectamente a través de phyB, el impacto promotor de *PIF4*, *PIF3*, *PIF5* y *PIF7* aumentó entre 10 - 28 °C, pero luego disminuyó entre 28 - 37 °C (**Figuras 3.2.E, F, G y L**). Esto es importante porque *PIF4*, *PIF5* y *PIF7* promueven directamente la síntesis de auxinas (*PIF3* presumiblemente también). Además, *PIF7* es un sensor de temperatura, por lo que su impacto fisiológico podría ser tanto a nivel de sensor como por su actividad como factor de transcripción. En este contexto, el aumento del impacto promotor a temperaturas cálidas correlaciona con el incremento en el crecimiento, mientras que la disminución en temperaturas muy altas coincide con la inhibición del crecimiento. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las altas temperaturas reducen la actividad de los PIFs, lo que conduce a la inhibición del crecimiento.

Los restantes componentes de la vía analizados no actúan directamente en la síntesis de auxina y no mostraron un patrón consistente con contribuir a la inhibición del crecimiento por temperaturas muy altas. *BZR1* y *BES1* son promotores del crecimiento y no cambiaron o elevaron su impacto genético en ese rango (**Figura**

3.2.M y N), mientras que HY5 es un inhibidor del crecimiento y disminuyó su impacto genético entre 22 - 37 °C (**Figura 3.2.O**).

Los resultados presentados en esta sección sugieren que el principal componente de la vía de percepción de la temperatura, phyB, así como los componentes río abajo que están involucrados en la síntesis de auxinas, PIF3, PIF4, PIF5 y PIF7, contribuyen a la inhibición del crecimiento por temperaturas muy alta.

Los cambios en el impacto inhibidor o promotor del crecimiento evidenciados por los experimentos genéticos podrían deberse a cambios moleculares y/o celulares de los componentes de señalización afectados, o a cambios en otros componentes de señalización que condicionan la acción de los primeros. Para dilucidarlo, a continuación, se estudiarán los cambios a nivel molecular y celular de los principales componentes de la vía, phyB, PIF4 y PIF7, así como los de BES1 y HY5. Si bien estos últimos no contribuyen a la inhibición por temperaturas muy altas, su impacto promotor e inhibitorio, respectivamente, muestran diferencias entre 28 °C y 37 °C que pueden aportar información valiosa sobre su regulación.

Los condensados nucleares de PhyB aumentan su tamaño en temperaturas muy altas

La dinámica de la formación de los condensados nucleares de phyB ha sido previamente descrita por nuestro grupo en el rango de temperaturas de 10 °C a 30 °C (Legris *et al.*, 2016). Utilizando los resultados conocidos como control, se amplió el estudio hacia el rango de temperaturas muy altas para explorar cómo afectan la formación de condensados nucleares de phyB. Para eso, se utilizaron plantas que expresan phyB fusionado a un reportero fluorescente para su análisis por microscopía confocal. En las tres líneas de phyB utilizadas en estos experimentos, se observó un patrón similar en respuesta a la temperatura (**Figura 3.4**). En temperaturas frías, 10 °C y 15 °C, el tamaño de los condensados es pequeño y similar entre las líneas, excepto en la línea *UBQ10:PHYB:YFP*, que presenta un aumento a 15 °C. En 22 °C se observa el incremento en el tamaño de los condensados y la disminución en 28 °C. Hasta aquí, los resultados son coherentes con los estudios previos realizados por Legris *et al.* (2016), donde se describe que el incremento del tamaño de los condensados desde temperaturas frías hacia las templadas y el desensamblaje de los condensados hacia

temperaturas cálidas. Sin embargo, en el rango de temperaturas muy altas el tamaño

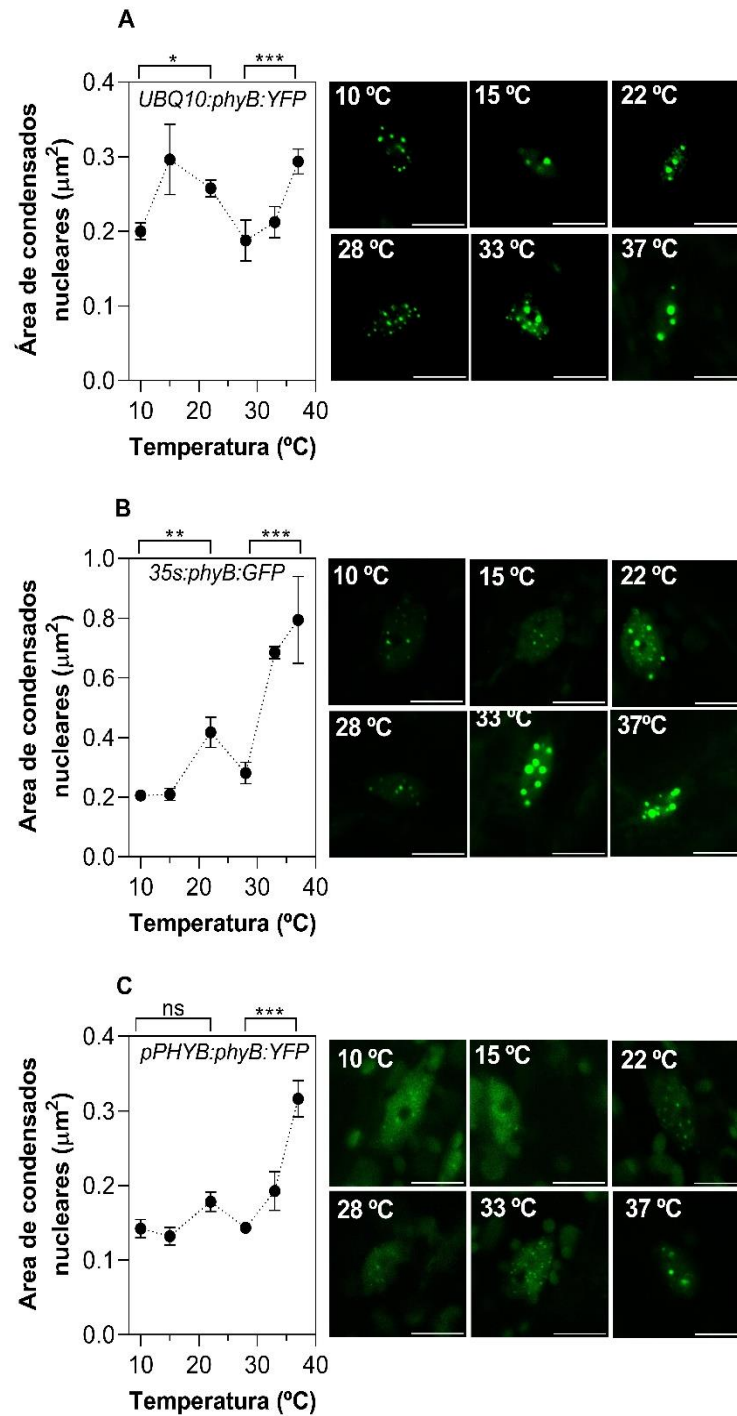


Figura 3.4. El tamaño de los condensados nucleares de phyB cambia con la temperatura. Área de los condensados nucleares de phyB en células del hipocotilo observado por microscopía confocal luego de 4 horas de tratamiento de temperatura a 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C, en las plantas reporteras de phyB, *UBQ10:phyB:YFP* (A), *35S:phyB:GFP* (B) y *pPHYB:phyB:YFP* (C). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 10-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes, para las cuales se tomó el promedio de 5 núcleos por planta. Análisis estadístico entre 10 °C, 15 °C y 22 °C corresponde a un ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák y entre 28 °C y 37 °C se hizo una regresión lineal.

de los condensados aumentó nuevamente, alcanzando los valores más altos a 37 °C (**Figura 3.4**).

Como se mencionó en la introducción, los condensados de phyB se forman por separación de fases líquido-líquido (Chen *et al.*, 2022). El aumento en la concentración de proteína favorece la separación de fases (**Figura 3**), por lo que una posible hipótesis es que el incremento de los condensados se deba al aumento en la proteína de phyB.

La abundancia de PhyB aumenta con la temperatura

Para analizar la abundancia de phyB se utilizaron dos aproximaciones. Por un lado, se cuantificó la cantidad de fluorescencia nuclear en las mismas líneas reporteras de phyB fusionadas a fluoróforos que se utilizaron para cuantificar los condensados nucleares por microscopía confocal. En este caso, se usó una configuración diferente que permitió sacar fotografías en mayor definición, evitando el fotoblanqueo que se genera en las ampliaciones y que disminuye especialmente la fluorescencia del nucleosoma (**Figura 3.5**). Por otro lado, se cuantificó la abundancia mediante *blots* de proteína (**Figura 3.6**).

La fluorescencia nuclear de phyB aumentó entre 10 - 37 °C en las tres líneas estudiadas (**Figura 3.5**). Además, se observa que la fluorescencia de los reporteros se localizó exclusivamente dentro de los núcleos de las células del hipocotilo, indicando que la localización subcelular de phyB es predominantemente nuclear en todo el rango de temperaturas estudiadas.

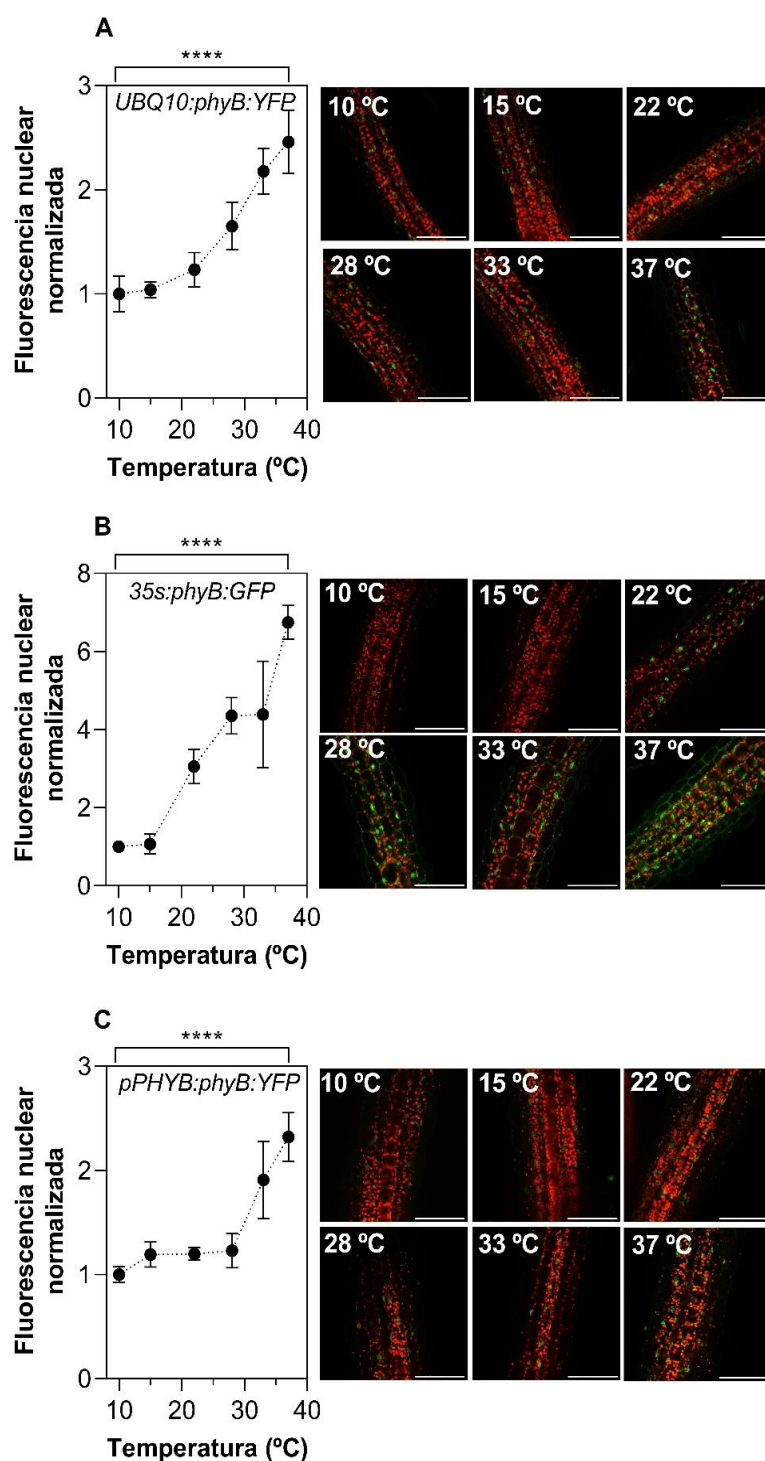


Figura 3.5. El incremento en la temperatura aumenta la abundancia de phyB
 Intensidad de fluorescencia nuclear de phyB en células del hipocotilo observado por microscopía confocal luego de 4 horas de tratamiento de temperatura a 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C, en las plantas reporteras de phyB, *UBQ10:phyB:YFP* (A), *35S:phyB:GFP* (B), *pPHYB:phyB:YFP* (C). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 10-12 réplicas biológicas en microscopía realizadas en tres experimentos independientes. Todos los valores están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes.

En los *blots* de proteína se observan dos bandas que corresponden presumiblemente a la forma fosforilada (banda superior, de mayor peso molecular) y la forma desfosforilada (banda inferior, de menor peso molecular) de phyB. Dado que varios aminoácidos en el extremo N-terminal son fosforilables en temperaturas cálidas, favoreciendo o estabilizando la reversión térmica (Viczián *et al.*, 2020), se cuantificaron por separado las bandas. Sin embargo, la abundancia entre las bandas es similar y ambas incrementan hacia temperaturas muy altas (**Figuras 3.6.C, D, E y F**), por lo cual se evaluó la cantidad total de phyB, sumando la intensidad de ambas bandas en cada condición de temperatura. Se observa que la línea bajo el promotor

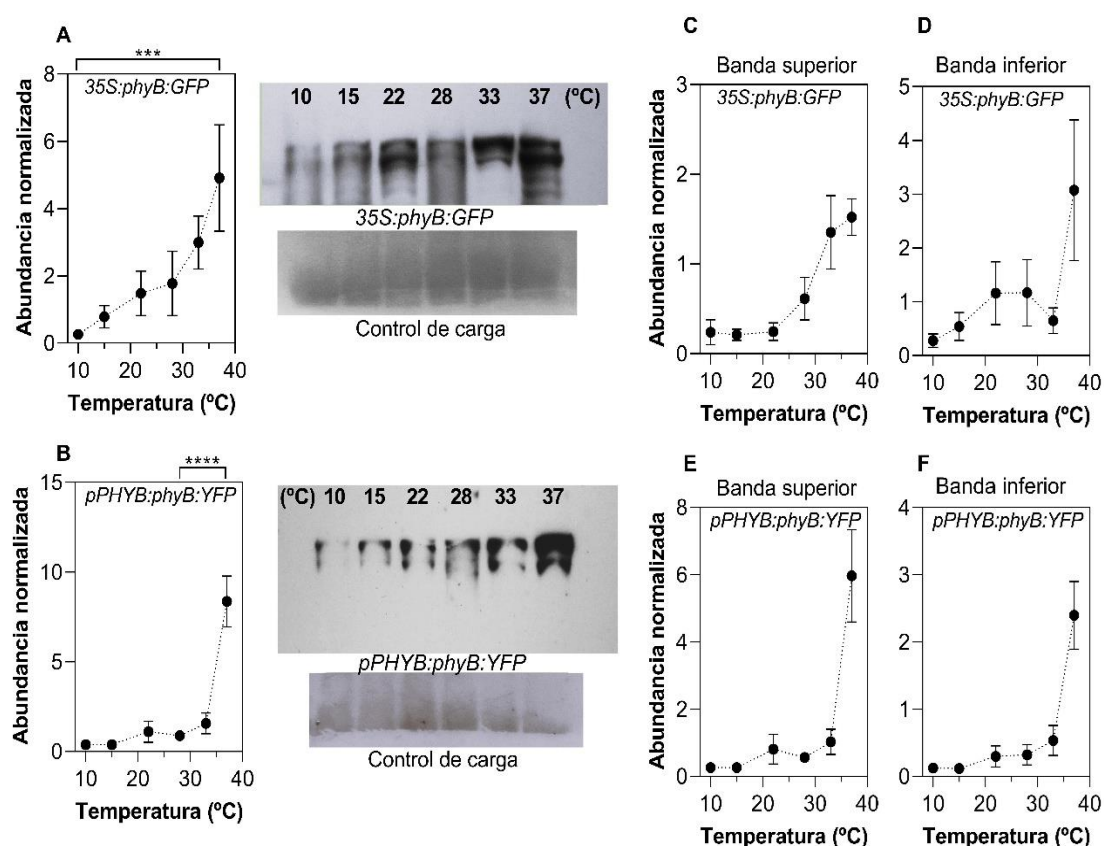


Figura 3.6. El incremento en la temperatura aumenta la abundancia de phyB. Abundancia de proteína de phyB medido por *blots* de proteína total luego de 4 horas de tratamiento de temperatura a 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C, usando plantas reporteras *35S:phyB:GFP* (**A**) y *pPHYB:phyB:YFP* (**B**). Además, se grafican los valores separados de las bandas superiores e inferiores de los *blots* de *35S:phyB:GFP* (**C** y **D**, respectivamente) y de *pPHYB:phyB:YFP* (**E** y **F**, respectivamente). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de cuatro réplicas biológicas realizadas en dos experimentos independientes. Todos los valores están normalizados a la cantidad de Rubisco correspondiente a cada banda. Análisis estadístico se hizo sobre el valor de proteína total (suma de bandas inferior y superior) y corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes, excepto para *pPHYB:phyB:YFP* (**B**) para el que se realizó un ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák.

fuerte 35S que phyB-GFP aumentó entre 10 - 37 °C, mientras que bajo el promotor endógeno phyB-YFP aumentó entre 28 - 37 °C (**Figuras 3.6.A y B**). Por lo tanto, el aumento de phyB en temperaturas muy altas es consistente con los resultados observados mediante microscopía confocal, reforzando la solidez de los datos.

Estos resultados muestran que temperaturas muy altas generan el aumento en la cantidad de proteína de phyB. Esto favorece la hipótesis de que el aumento del tamaño de condensados de phyB se debe, al menos en parte, al aumento en la cantidad de proteínas.

Hasta aquí se ha demostrado que las temperaturas muy altas no sólo aumentan el impacto inhibitorio de phyB (posiblemente por la recuperación de la actividad de phyB) sino que también favorecen la formación de condensados y mayor acumulación de proteína.

Las temperaturas muy altas disminuyen la abundancia de PIF4

Para caracterizar la dinámica de PIF4 en respuesta a la temperatura se utilizaron plantas con reporteros para medir por luminiscencia, en *blots* de proteína y por microscopía confocal. Como la función de PIF4 se manifiesta (aunque con diferencias) tanto en hipocotilos como en cotiledones (Casal & Fankhauser, 2013), se analizó su respuesta en ambos órganos (**Figuras 3.7 - 3.9**). Además, las observaciones fueron realizadas a las 4 y 8 horas de tratamiento de temperatura para tener mejor información sobre la cinética de los cambios (**Figuras 3.8 y 3.9**).

En *blots* de proteínas se observa que la abundancia de PIF4-HA aumentó entre 22 - 28 °C y luego disminuyó en temperaturas muy altas (**Figura 3.7.A**). La señal de luminiscencia de plantas PIF4:LUC muestra un patrón similar, con la diferencia de que la disminución se observa entre los 33 °C y 37 °C (**Figura 3.7.B**). Es importante mencionar que la señal de la luciferasa proviene mayoritariamente de los cotiledones,

ya que se mide la bioluminiscencia desde arriba, y en los *blots* de proteínas ocurre algo similar porque la mayor proporción de tejido de las plantas de 4 días es de cotiledones.

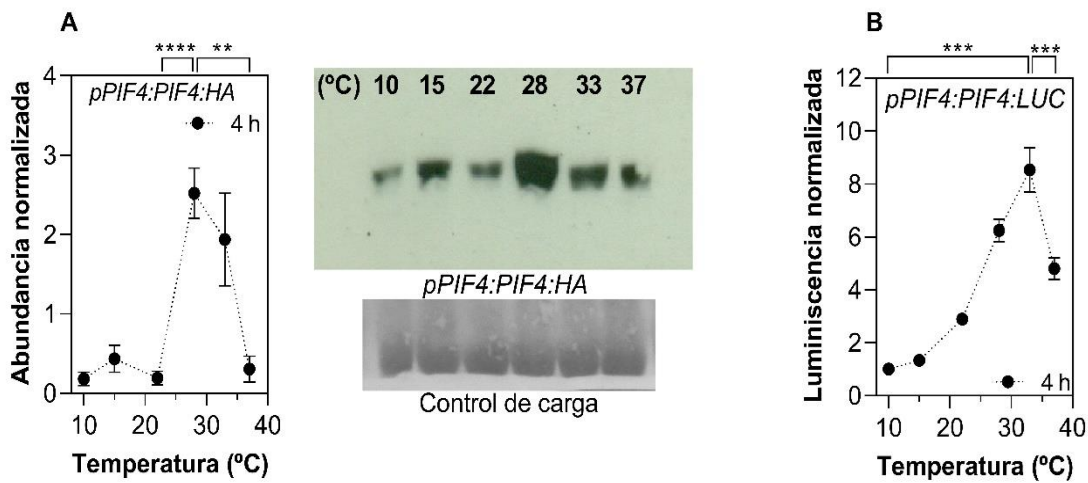


Figura 3.7. PIF4 disminuye su abundancia en temperatura muy alta. Abundancia de proteína de PIF4-HA medido en *blots* de proteína en plantas *pPIF4:PIF4:HA* (A) y mediciones de luminiscencia de plantas *pPIF4:PIF4:LUC* (B). Todas las plantas fueron tratadas durante 4 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 4 réplicas biológicas para el *blot*, realizadas en dos experimentos independientes, y 3 réplicas biológicas para el ensayo de luminiscencia, realizado en tres experimentos independientes. La abundancia de proteína está normalizada la cantidad de Rubisco correspondiente a cada banda y los valores de luminiscencia están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal, excepto en *pPIF4:PIF4:HA* entre 10 °C y 28 °C y *pPIF4:PIF4:LUC* entre 28 °C y 37 °C, donde se hizo un ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák

En microscopía confocal, a las 4 horas de tratamiento se observa que la fluorescencia de plantas PIF4-GFP aumentó hasta 33 °C y luego disminuyó levemente en 37 °C, mientras que en el hipocotilo continuó aumentando (**Figura 3.8**). A las 8 horas se observa que la disminución en los cotiledones ocurre entre 28 - 37 °C, mientras en hipocotilos continuó aumentando con la temperatura (**Figura 3.9**), aunque el aumento no es tan pronunciado como a las 4 horas.

Por otro lado, la señal de plantas *pPIF4:LUC* aumentó entre 10 - 28 °C y disminuyó entre 28 - 37 °C (**Figura 3.10**), sugiriendo una regulación del promotor *PIF4*. Como el termosensor ELF3 regula la transcripción de *PIF4* al unirse al promotor, se midió la señal de *pPIF4:LUC* en el fondo mutante de *elf3* (**Figura 3.10**). Se observó que la luminiscencia fue más baja en el fondo salvaje que en el fondo mutante, siendo consistente con el control que ejerce ELF3 sobre PIF4, pero no se registró un efecto distintivo en temperaturas muy altas.

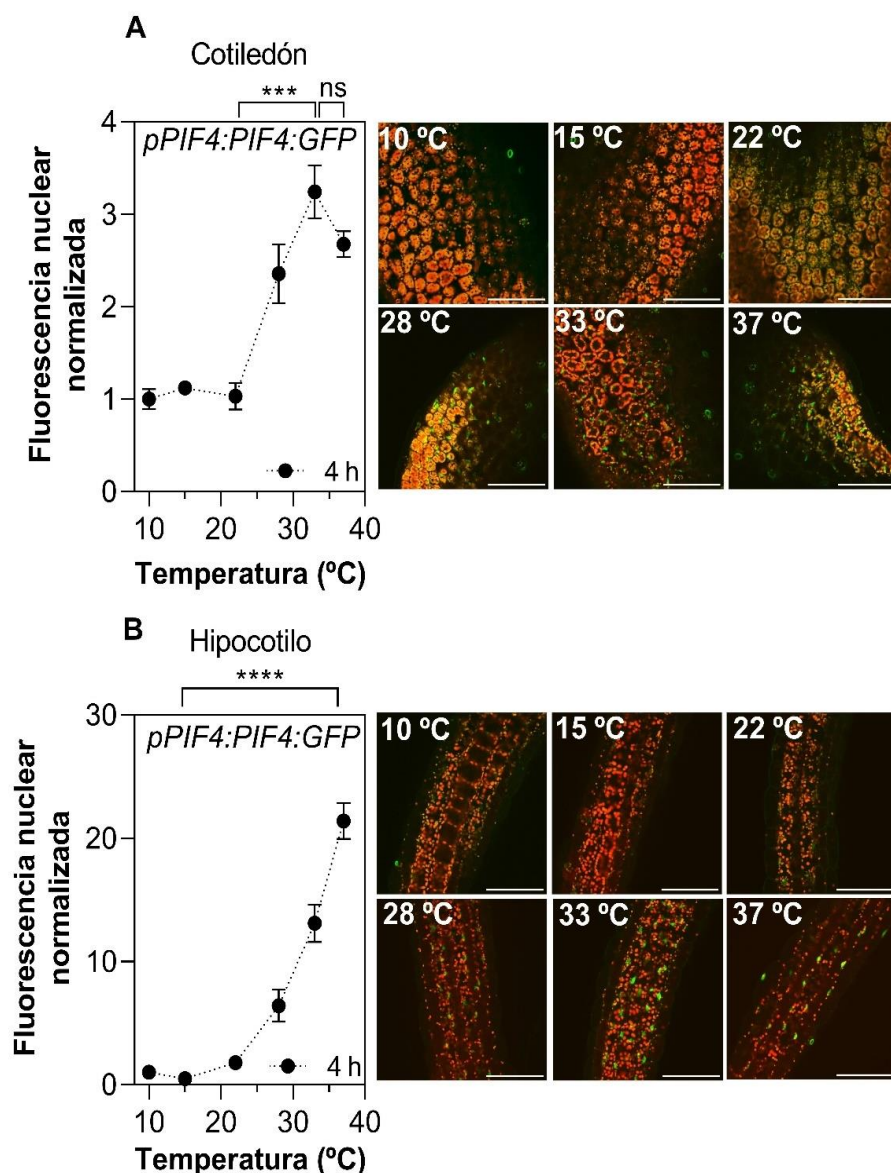


Figura 3.8. PIF4 continúa aumentando su abundancia nuclear en hypocotilos, pero no en cotiledones. Microscopía confocal en plantas de la línea *pPIF4:PIF4:GFP* tratadas durante 4 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Se muestra fluorescencia nuclear de células de cotiledones (A) y de hypocotilos (B). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Todos los valores están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal, excepto en cotiledones donde se hizo ANOVA entre 28 °C y 37 °C seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák

En resumen, estos resultados muestran que la abundancia de PIF4 disminuye a temperaturas muy altas específicamente en los cotiledones. Parte de este efecto se debe a una menor actividad del promotor PIF4. PIF4 induce la síntesis de auxina en los cotiledones (Kim *et al.*, 2020) de modo que la menor abundancia de PIF4 explicaría la caída en los niveles y señalización de auxina a que se asocian a su vez a la caída del crecimiento del hypocotilo a temperaturas muy altas.

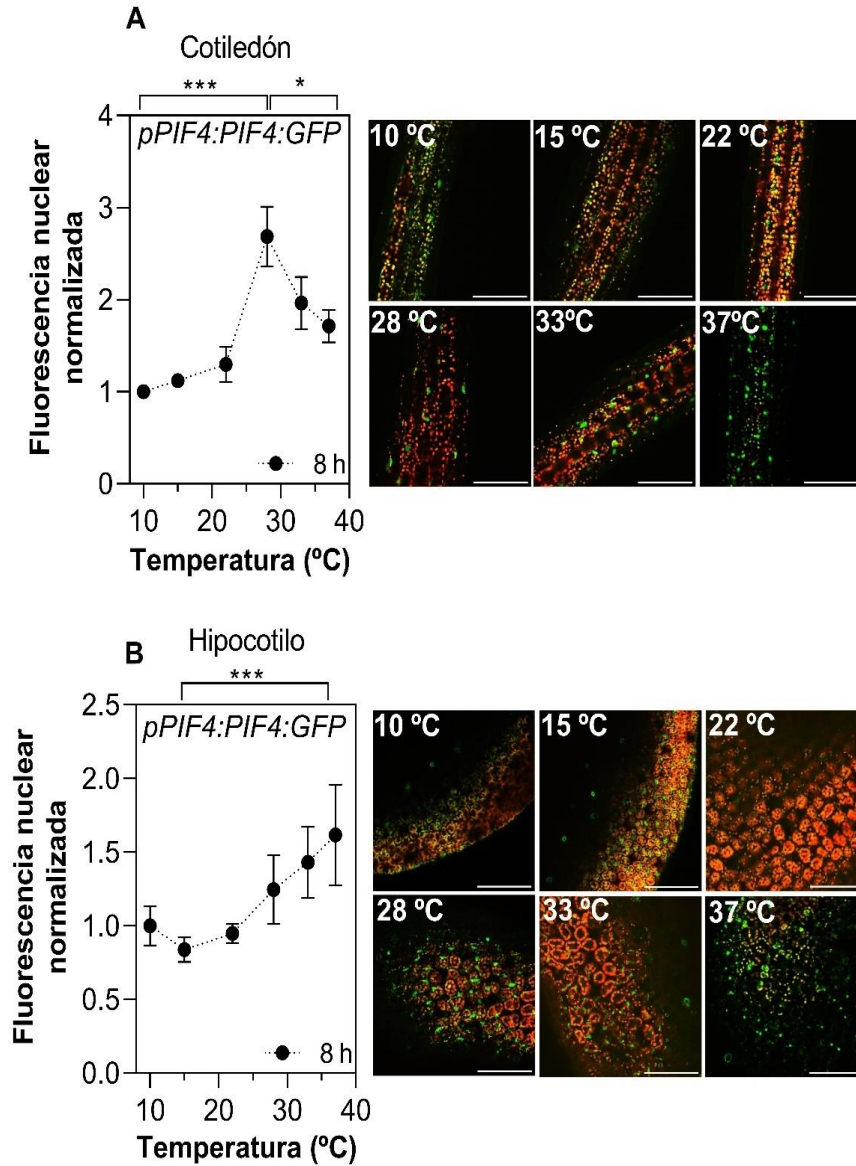


Figura 3.9. Luego de 8 horas, PIF4 disminuye en los cotiledones en temperaturas muy altas. Microscopía confocal en plantas *pPIF4:PIF4:GFP* tratadas durante 8 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Se muestra fluorescencia nuclear de células de cotiledones (**A**) y de hipocotilos (**B**). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Todos los valores están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal.

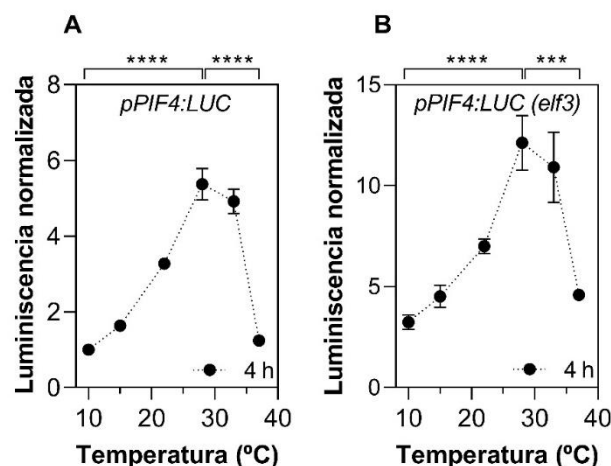


Figura 3.10. La expresión de PIF4 disminuye en temperatura muy alta y es controlada por ELF3. Luminiscencia de plantas *pPIF4:LUC* (B) y *pPIF4:LUC (elf3)* (D). Todas las plantas fueron tratadas durante 4 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio ± EE de tres réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Todos los valores están normalizados a los de 10 °C para el genotipo *pPIF4:LUC*. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal, excepto en *pPIF4:LUC* entre 28 °C y 37 °C donde se hizo un ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák

PIF7 aumenta su abundancia aún en temperaturas muy altas

Para analizar la dinámica de proteína de PIF7, se usaron plantas reporteras PIF7-HA para visualizar su abundancia por *blots* de proteína y se midió a las 4 y 8 horas de tratamiento de temperatura. Además, se midió la expresión del gen *PIF7* (Figura 3.11).

Se observaron dos bandas que corresponden presumiblemente a las formas fosforilada de PIF7 (banda superior, de mayor peso molecular) y defosforilada (banda inferior, de menor peso molecular). Por similitudes en la respuesta de ambas bandas a la temperatura (Figuras 3.11.B y C) se sumaron las dos bandas para determinar la cantidad de PIF7 total. Se observó que PIF7-HA aumenta entre 22 - 37 °C, tanto a las 4 horas como a las 8 horas de tratamiento (Figura 3.11.A). Por otro lado, la expresión de *PIF7* aumentó entre 28 - 37 °C, aunque no se logró observar el aumento esperado de la expresión entre 22 - 28 °C (Figura 3.11.D).

Estos resultados muestran que, proyectando la tendencia observada en un rango de temperaturas más bajas, la abundancia de PIF7 aumenta en temperaturas muy altas y esto se debería, al menos en parte, a una mayor expresión del gen *PIF7*. En temperaturas muy altas el impacto promotor del crecimiento de *PIF7* disminuye. Claramente, esto no se debe a que haya menos PIF7. El menor impacto de PIF7 en este rango de temperaturas podría ser una consecuencia indirecta de la caída de PIF4

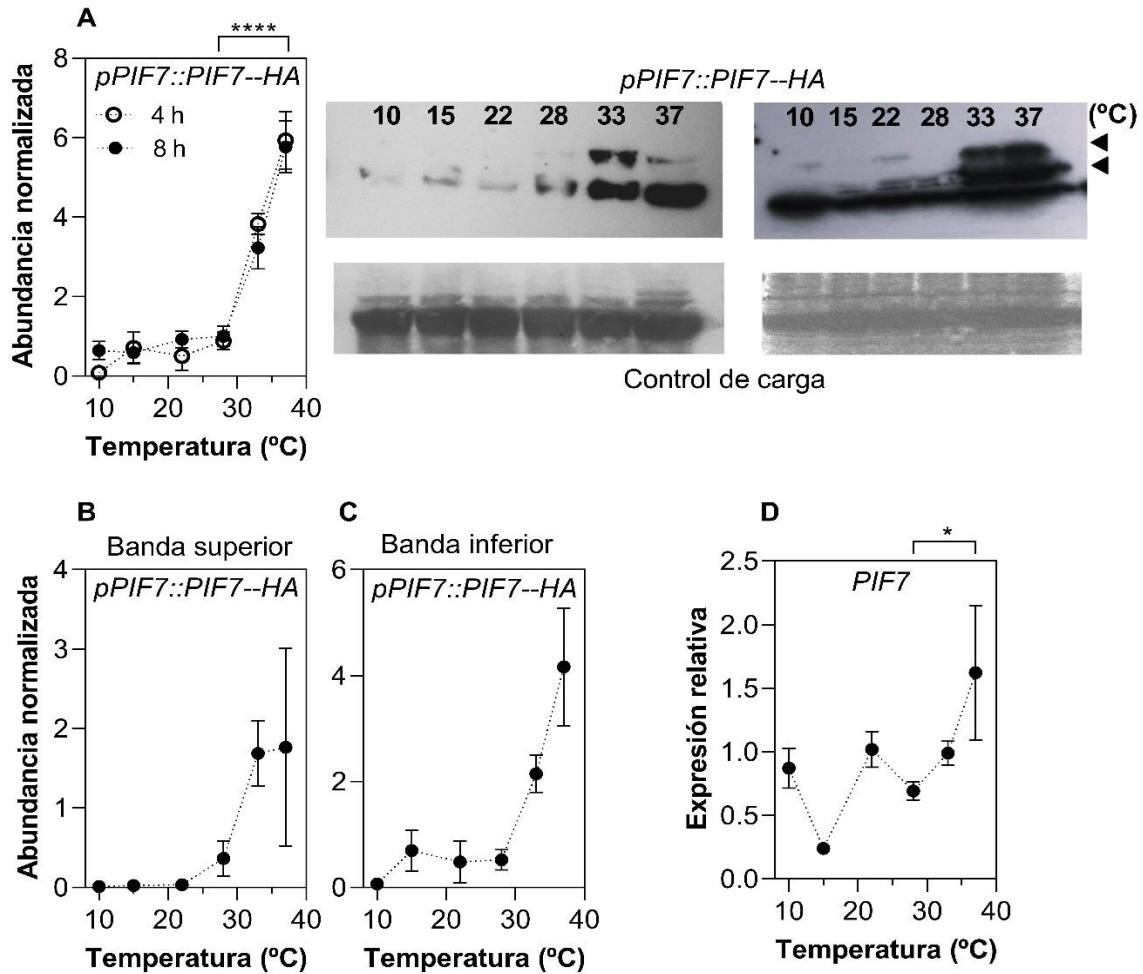


Figura 3.11. La abundancia de PIF7 y la expresión del gen aumentan en temperaturas muy altas. Abundancia de proteína en plantas tratadas durante 4 horas u 8 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C (A) y se grafican por separado los valores de las bandas superior (B) e inferior (C) para las 4 horas de tratamiento de temperatura. Expresión de *PIF7* relativa a *UBQ2* en plantas de genotipo salvaje tratadas durante 4 horas a las mismas temperaturas (D). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de cuatro réplicas biológicas para los *blots* de proteína, realizados en dos experimentos independientes, y para tres réplicas biológicas para los niveles de expresión, realizado en un único experimento. La abundancia de proteína está normalizada a la cantidad de Rubisco correspondiente a cada banda y los niveles de expresión están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes

porque PIF7 actúa como heterodímero con PIF4 (Kidokoro *et al.*, 2009, Chung *et al.*, 2020, Fiorucci *et al.*, 2020).

Temperaturas muy altas aumentan la abundancia nuclear de BES1

Para analizar la dinámica de proteína de BES1 en células del hipocotilo, se usaron plantas reporteras BES1-GFP y se midió a las 4 y 8 horas de tratamiento de temperatura por microscopía confocal (**Figura 3.12**).

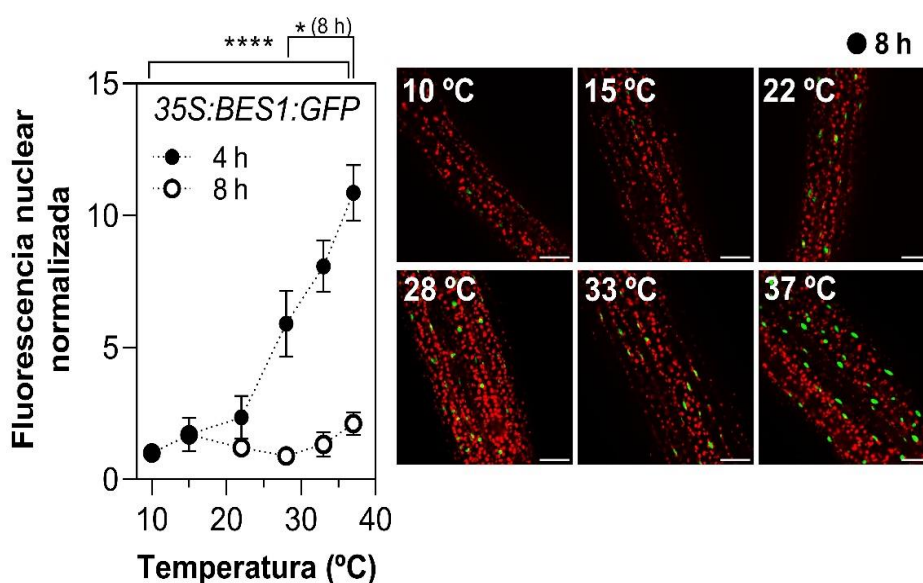


Figura 3.12. BES1-GFP aumenta en temperaturas muy altas en el hipocotilo. Intensidad de fluorescencia nuclear en células del hipocotilo medido por microscopía confocal en plantas *35S:BES1:GFP* tratadas durante 4 y 8 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Todos los valores están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal.

Se observó que, luego de 4 horas de tratamiento de temperatura, la fluorescencia nuclear de BES1-GFP en células del hipocotilo aumentó en todo el rango de temperaturas (**Figura 3.12**), proyectando hacia el rango de temperaturas altas la tendencia ya reportadas entre 20 °C y 28 °C (Costigliolo *et al.*, 2022, Jacob *et al.*, 2025). En mediciones realizadas más tarde dentro del fotoperíodo (correspondiente a las 8 horas de tratamiento con distintas temperaturas) la fluorescencia disminuyó con respecto a las 4 horas, pero, sin embargo, continuó el aumento entre 28 - 37 °C (**Figura 3.12**).

El aumento en la abundancia nuclear de BES1-GFP en temperaturas muy altas correlaciona con el aumento en el impacto promotor del gen. Por lo tanto, se infiere que la actividad de BES1 en temperaturas muy altas impacta sobre el crecimiento, pero a contramano de la tendencia dominante que lleva a una menor tasa de elongación del hipocotilo.

Temperaturas muy altas aumentan la abundancia nuclear de HY5

Por último, para caracterizar a HY5 se utilizaron plantas HY5-GFP para visualizar por microscopía confocal a las 4 y 8 horas de tratamiento de temperatura en células del hipocotilo (**Figura 3.13**).

Se observó que la fluorescencia nuclear de HY5-GFP aumentó entre 22 - 37 °C a las 4 horas de tratamiento, pero que el patrón se define mejor a las 8 horas, mostrando la disminución entre 15 - 28 °C y un aumento más pronunciado entre 28 - 37 °C (**Figura 3.13**).

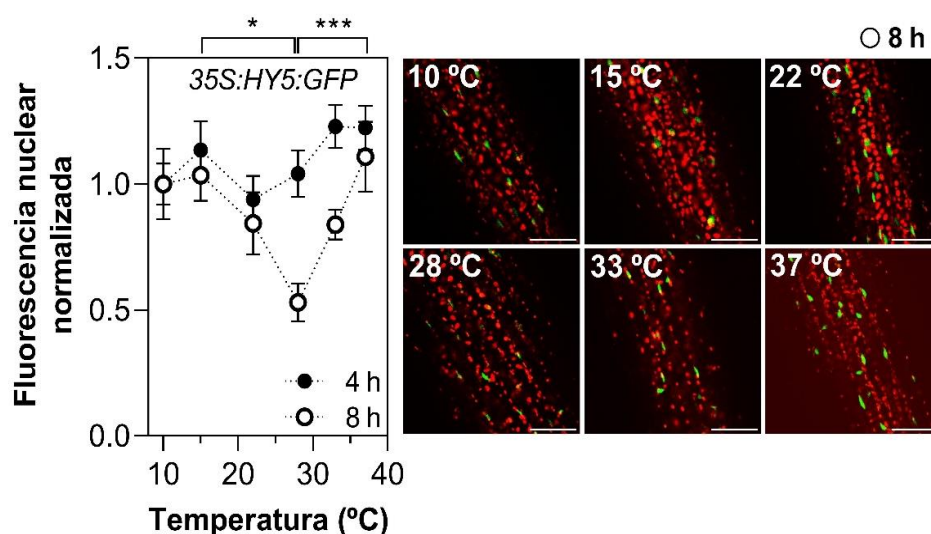


Figura 3.13. HY5 aumenta en temperaturas muy altas en células del hipocotilo. Intensidad de fluorescencia nuclear en células del hipocotilo medido por microscopía confocal en plantas *35S:HY5:GFP* tratadas durante 4 y 8 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 8-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. Todos los valores están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal a las 8 horas.

El aumento en la abundancia de HY5-GFP en células del hipocotilo en temperaturas muy altas no correlaciona con la disminución del impacto inhibitorio del gen en esas temperaturas.

En conclusión, los resultados de esta sección sugieren que el módulo phyB-PIF4 es el principal, al menos de los genes estudiados en esta tesis, involucrado en la regulación del crecimiento en temperaturas muy altas. Dicha regulación impactaría principalmente en la disminución de las auxinas en los cotiledones.

Capítulo

4

**Las temperaturas muy altas estabilizan
a los condensados aún si en ellos
predomina Pr**



Impacto de la foto-transformación de phyB en la inhibición del crecimiento por temperaturas muy altas

Al analizar el impacto inhibitorio de phyB se observa una caída a medida que se progresa a temperaturas más cálidas y la recuperación del impacto por encima de los 28 °C (**Figura 3.2**). Este patrón podría interpretarse como el balance entre dos procesos opuestos. Por un lado, el aumento en la temperatura acelera la reversión térmica de Pfr-Pfr a Pr-Pr, reduciendo el nivel de Pfr (Legrís *et al.*, 2016). Por el contrario, el aumento de los niveles de proteína de phyB causan un incremento del nivel de Pfr. Según esta interpretación, cuando aumenta la temperatura por debajo de los 28 °C predomina el efecto causado por la aceleración de la reversión. Por encima de los 28 °C predomina el efecto causado por mayores niveles totales de proteína de phyB. Sin embargo, no hay información del impacto de temperaturas mayores a 28 °C sobre la velocidad de la reversión térmica. Si la velocidad continuase aumentando exponencialmente por encima de los 28 °C (como lo hace por debajo de esa temperatura, según Legris *et al.*, 2016 y Jung *et al.*, 2016), el aumento lineal de los niveles de temperatura que se observa en estos experimentos no explicaría el quiebre de la tendencia del efecto inhibitorio de phyB. Por ese motivo, resulta necesario estimar la tendencia de la tasa de reversión térmica a temperaturas muy altas. La tasa de reversión térmica puede medirse directamente por espectrofotometría, pero no en las condiciones fisiológicas de interés, porque la presencia de clorofila distorsiona las observaciones. Es necesaria, entonces, una estimación basada en observaciones fisiológicas.

Para estimar fisiológicamente la tasa de reversión térmica, plantas de *Arabidopsis* fueron tratadas con tres condiciones de luz: (a) un pulso de luz roja al principio del día seguido de oscuridad; (b) pulsos de luz roja cada hora seguidos de oscuridad, y (c) un pulso de luz roja lejana al principio del día seguido de oscuridad. Las plantas fueron a su vez expuestas a 28 °C o 37 °C inmediatamente después de finalizado el primer pulso de luz. La luz roja promueve la conversión de Pr-Pr a Pfr-Pfr, la luz roja lejana produce la foto-conversión del Pfr-Pfr a Pr-Pr y la temperatura cálida favorece la reversión térmica de Pfr-Pfr a Pr-Pr (**Figura 2**). Por lo tanto, un único pulso de luz roja induce la activación de phyB pero el Pfr formado revierte térmicamente, liberando al hipocotilo de la inhibición causada por Pfr-Pfr. En cambio, los pulsos horarios de rojo vuelven a formar Pfr-Pfr, contrarrestando la reversión

térmica ocurrida y, por lo tanto, causando una mayor inhibición del crecimiento del hipocotilo (Mazzella *et al.*, 1997). Finalmente, la luz roja lejana rápidamente inactiva a phyB, por lo cual se esperaría ver la promoción del crecimiento. La comparación entre el crecimiento del hipocotilo en pulsos horarios de rojo versus un pulso de rojo seguido de oscuridad permite inferir la magnitud de la reversión térmica y de ese modo compararla entre distintas temperaturas. La comparación entre pulsos horarios de rojo y un pulso de rojo lejano permite inferir la magnitud del efecto que potencialmente tiene el phyB (al comparar máxima y mínima activación, respectivamente).

El análisis descrito en el párrafo anterior debe realizarse primariamente en plantas de genotipo salvaje y mutantes *phyb*. Sin embargo, como el objetivo del experimento es inferir cambios en la tasa de reversión térmica se incluyeron variantes de phyB o de mutantes de proteínas que interactúan con phyB, que (en ambos casos) modifican la regulación endógena de la tasa de reversión térmica. Entonces, se utilizaron plantas que expresan phyB (*35S:PHYB-YFP*, *pPHYB:PHYB-YFP*) mutado en el residuo S86. Este residuo es un sitio de fosforilación, que al ser fosforilado favorece la reversión térmica (Viczan *et al.*, 2020). La mutación S86A reemplaza la Serina por Alanina, un residuo no fosforilable, y la mutación S86D reemplaza por Ácido Aspártico y produce la imitación del sitio fosforilado (fosfo-mímica) (Ádam *et al.*, 2011, Viczan *et al.*, 2020). Además, se incluyeron las mutantes de dos proteínas que favorecen la estabilidad del Pfr (*pchl1*, *pchl* y el doble mutante *pchl1 pchl*) (Enderle *et al.*, 2017, Murcia *et al.*, 2020). Si el análisis en Col-o sugiere cambios en la tasa de reversión térmica, las líneas con mutaciones en sitios de fosforilación y las mutantes *pchl1* y *pchl* permitirían evaluar si estos cambios se deben a alguno de estos dos mecanismos de regulación.

El experimento del panel A (**Figura 4.1.A**) se analizó usando el crecimiento de Col-o en 28 °C con luz roja como referencia en una regresión lineal múltiple *stepwise* (el análisis detallado se muestra la **Tabla 2, Anexo**), obteniendo que el efecto de la luz y de la temperatura impactaron significativamente en el crecimiento: a 28 °C, los pulsos de rojo redujeron el crecimiento (-0.0055 ; $p = 0.0018$), mientras que la luz roja lejana lo promovió ($+0.0101$; $p < 0.001$), de forma consistente con lo esperado. Sin embargo, llamativamente, el efecto promotor del crecimiento de la roja lejana se perdió a 37 °C (-0.0110 ; $p < 0.001$). Por otro lado, las plantas de Col-o y las mutantes

de PCH mostraron respuestas similares y la pérdida de PCH1/PCHL no revirtió la inhibición de la temperatura muy alta. En el mutante *phyb*, analizado por separado, el crecimiento fue el mismo en todas las condiciones de luz, pero disminuyó a 37 °C (-0.0277 , $p < 0.001$). Sin embargo, es importante destacar que el crecimiento de *phyb* fue mayor que el de Col-o en luz roja a 28 °C (prueba de t, $p = 0.0039$) y a 37 °C ($p = 0.0334$), lo que permite adjudicarle a phyB la inhibición que persiste en temperatura muy alta.

El experimento del panel B (**Figura 4.1.B**) se analizó de la misma forma, pero usando como referencia el crecimiento de *35S:PHYB-YFP* a 28 °C con luz roja, para comparar con los genotipos mutantes que están bajo el mismo promotor, *586A (35S)* y *586D (35S)*. El análisis mostró el mismo patrón general con los efectos significativos de pulsos de luz roja y rojo lejano a 28 °C, con un efecto adicional del genotipo: *586A* mostró menor crecimiento en luz roja (-0.0088 ; $p = 0.003$), y *586D* mayor ($+0.0091$; $p = 0.002$), consistente con el impacto esperado sobre la reversión térmica. En este caso las mutaciones tampoco revirtieron la inhibición a 37 °C.

El resultado más interesante de este experimento es que a 37 °C el crecimiento fue menor en plantas Col-o, incluso con un pulso de luz roja lejana que foto-convierte phyB de Pfr-Pfr a Pr-Pr (**Figura 4.1**). Aunque el propósito original de este experimento era evaluar si la exposición a 37 °C anulaba la diferencia entre un pulso de rojo seguido de oscuridad y pulsos horarios de rojo, dando indicios de una menor reversión térmica y esa predicción se cumplió, la falta de promoción por rojo lejano a 37 °C no permite esa conclusión. La falta de respuesta a rojo lejano indica que el crecimiento está limitado en un paso posterior al nivel de Pfr-Pfr (y por lo tanto a lo que pueda hacer la reversión térmica) y no es posible adjudicarlo a la recuperación de la actividad de phyB.

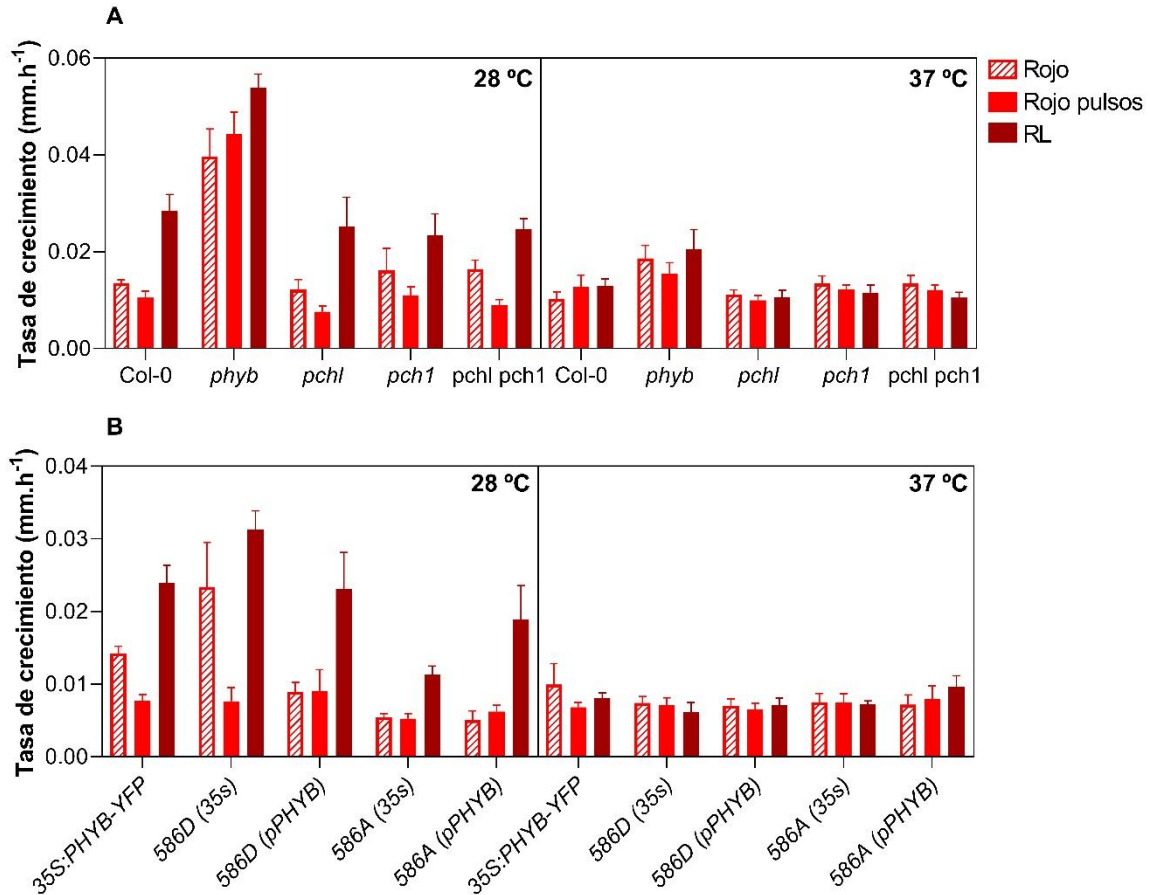


Figura 4.1. La temperatura muy alta contrarresta el efecto de la reversión por luz inhibiendo el crecimiento. Tasa de crecimiento del hipocotilo en plantas de genotipo salvaje (Col-0) y mutantes *phyb*, *pchl*, *pchl1* y *pchl pchl1*, en 28 °C y 37 °C bajo un único pulso de luz roja al inicio del día (R), un pulso de luz roja cada 1 h (Rojo pulsos), o un pulso de luz roja lejana al inicio del día (RL), todas seguidas de oscuridad (A). Tasa de crecimiento del hipocotilo en plantas transgénicas *35S:PHYB-YFP* y variantes de fosfo-miméticas (586D) y no fosforilables (S86A) de *PHYB-YFP* bajo el promotor constitutivo 35S o el promotor endógeno (*pPHYB*), en las mismas condiciones de luz y temperatura (B). Los datos corresponden al promedio $\pm$ error estándar (EE) de 6 réplicas biológicas, obtenidas en dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante regresión lineal múltiple *stepwise* con las variables genotipo, luz y temperatura; los resultados se muestran detallados en el Anexo.

Impacto de la foto-transformación de phyB en la formación de condensados nucleares por temperaturas muy altas

Para evaluar la dinámica de los condensados nucleares de phyB en las combinaciones de tratamientos lumínicos y de temperatura, se utilizaron plantas que expresan el transgén *UBQ10:PHYB-YFP* en experimentos de microscopía confocal (**Figura 4.2**).

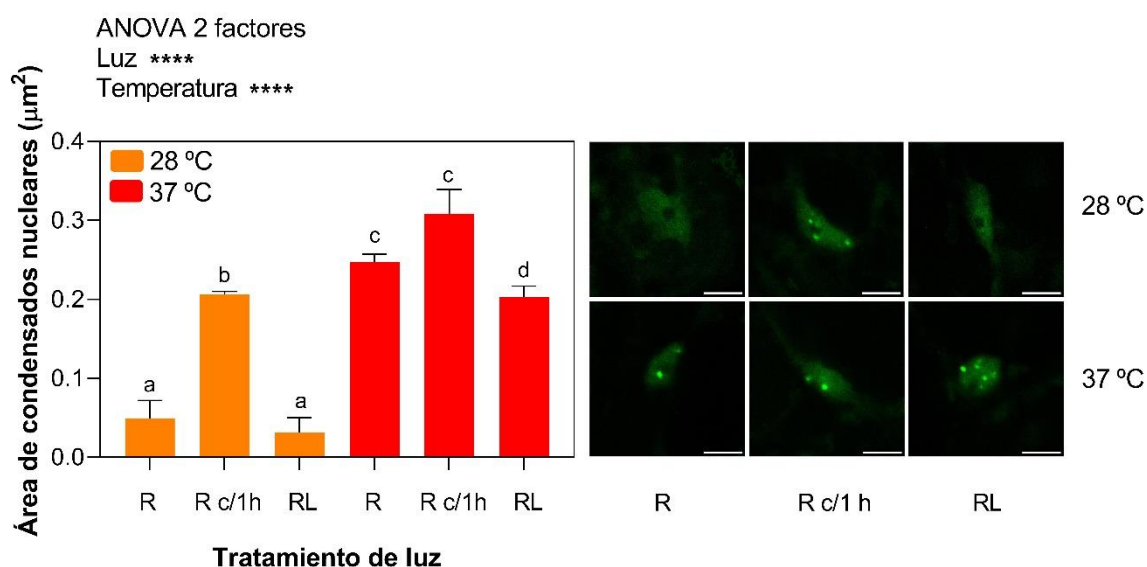


Figura 4.2. La temperatura muy alta favorece la formación de condensados en luz roja y roja lejana. Tamaño de los condensados nucleares de phyB-YFP medidos por microscopía confocal, en plantas *UBQ10:PHYB-YFP* tratadas con 28 °C o 37 °C y un pulso de luz roja (R) al principio del día seguido de oscuridad, un pulso de luz roja al principio del día y cada una hora seguido de oscuridad, y un pulso de luz roja lejana (RL) al principio del día seguido de oscuridad. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 10-12 réplicas biológicas realizadas en dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos factores (luz y temperatura), seguido de prueba de Tukey. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre combinaciones de genotipo y condición de luz.

Para evaluar cómo se afectaba la dinámica de formación de condensados producto de las combinaciones lumínicas, se realizó al mismo tiempo un experimento con la mismas condiciones lumínicas con plantas *UBQ10:phyB-YFP* para observar en microscopía confocal (**Figura 4.2**).

En plantas transferidas a 28 °C luego de un único pulso de luz roja seguido de oscuridad, la temperatura cálida permitió la rápida reversión térmica de Pfr-Pfr a Pr-Pr y, en consecuencia, 4 h más tarde el tamaño de los condensados de phyB resultó pequeño. En cambio, la foto-conversión causada por los pulsos horarios de luz roja compite con el efecto de la reversión térmica y en esa condición los condensados no se

desarmaron, consistentemente con la presencia de Pfr-Pfr. Por último, la combinación de temperatura cálida con luz roja lejana induce la foto-conversión hacia Pr-Pr y esto generó el desarmado de los condensados (**Figura 4.2**). Sorprendentemente, a 37 °C el tamaño de los condensados se mantuvo en todas las condiciones lumínicas, incluso luego de un pulso de luz roja lejana. Esto muestra que las temperaturas muy altas no permiten el desensamblaje de los condensados, o bien que favorecen el ensamblaje. La disolución de los condensados nucleares de phyB luego de la exposición a rojo lejano es una observación repetidamente reportada en la literatura (Rausenberger *et al.*, 2010, Klose *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2003) y confirmada aquí a 28 °C. Por tal motivo, la estabilidad a 37 °C de dichos condensados donde predomina Pr-Pr era completamente inesperada. Pero, además, estos resultados son consistentes con los resultados del experimento fisiológico, indicando que phyB mantiene actividad en 37 °C incluso luego de un pulso de luz roja lejana (**Figura 4.1**) porque se observan condensados en esa condición, mostrando que phyB está dentro del núcleo.

En resumen, los resultados de esta sección indican que a 37 °C phyB está en mayor abundancia que en temperaturas menores y que está activo, al menos en alguna proporción biológicamente relevante, dentro de condensados nucleares promoviendo la inhibición del crecimiento, incluso bajo condiciones lumínicas que normalmente inducen su inactivación. Estos resultados muestran que la temperatura modula de forma muy interesante la actividad de phyB y su capacidad de responder a señales lumínicas, posiblemente favoreciendo una señalización de phyB sostenida o dominante en temperaturas muy altas.

El efecto de la temperatura en condensados de phyB en un sistema ortogonal

Como phyB forma condensados más grandes en temperaturas muy altas respecto de otras temperaturas (**Figura 3.4**), podría ocurrir que esta sea una capacidad inherente de phyB o bien una consecuencia de la regulación del entorno celular vegetal en el que se encuentra phyB. Para estudiarlo, en esta sección se utilizó un sistema ortogonal de expresión que permite estudiar a phyB por fuera del entorno celular vegetal, expresando a phyB con un reportero para visualizar su localización y abundancia por microscopía confocal en células de mamíferos. phyB ya es utilizado frecuentemente en células de mamíferos aprovechando su capacidad fotorreceptora en herramientas optogenéticas (Müller *et al.*, 2014; Ochoa-Fernandez *et al.*, 2020).

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Matías Zurbriggen en el marco de una beca DAAD 2024 que me fue otorgada.

Antes de analizar los condensados de phyB en temperaturas muy altas en células de mamíferos, se estudió su dinámica en respuesta a cambios entre temperaturas templadas y cálidas en el sistema ortogonal. Para eso, células transfectadas se iluminaron con un pulso de luz roja seguido de un tratamiento de 22 °C o de 28 °C en oscuridad, para que la reversión térmica, de ocurrir, no compitiera con el efecto opuesto generado por la luz roja (**Figura 4.3**).

Los resultados muestran que los condensados de phyB en células expuestas a 22 °C son más grandes que los de células expuestas a 28°C (**Figura 4.3**). Por lo tanto,

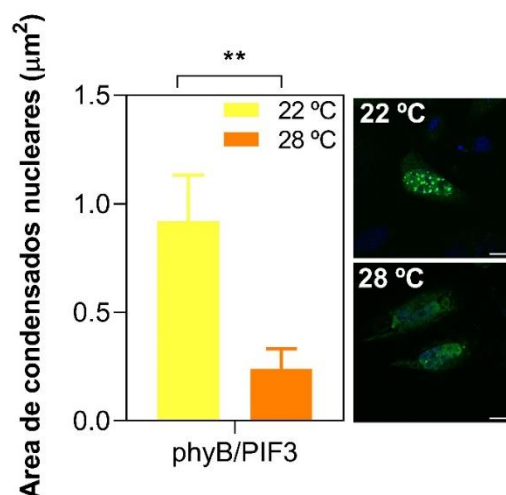


Figura 4.3. Temperaturas cálidas desarman los condensados de phyB en células de mamíferos. Área de los condensados nucleares de phyB en células de mamífero CHO-K1 observadas por microscopía confocal luego de un pulso de 15 minutos de luz roja seguido de oscuridad a 22 °C o 28 °C. Las células fueron transfectadas con los plásmidos *p40S:phyB-eGFP* + *p40S:PIF3-eCerulean* (**phyB/PIF3**). Los valores graficados corresponden al promedio ± EE de 8-10 réplicas biológicas realizadas en dos experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a comparación de medias mediante la prueba pareada de t.

los condensados de phyB se ensamblan en temperaturas templadas y se desensamblan en temperaturas cálidas, tal como sucede en las plantas (Legris *et al.*, 2014, **Figura 3.4**). Sin embargo, esto no demuestra que el desensamblaje ocurra debido a la reversión térmica de phyB porque podría ser una consecuencia propia de la temperatura sobre los condensados.

Para evaluar si el desensamblaje de los condensados a temperaturas cálidas se debe a la reversión térmica de phyB o a un efecto directo de la temperatura sobre los condensados, se diseñó un experimento que permite discriminar entre ambas posibilidades. Se aprovechó que la luz roja continua convierte más eficientemente las moléculas de phyB del estado inactivo Pr-Pr al estado activo Pfr-Pfr, superando el efecto opuesto de la reversión térmica (que convierte Pfr-Pfr a Pr-Pr en temperaturas cálidas). De este modo, el impacto de la reversión térmica se atenúa bajo luz roja continua. Se compararon dos condiciones: un grupo de células recibió un pulso de luz roja seguido de oscuridad, y otro fue expuesto a luz roja continua, ambos a 22 °C y 28 °C (**Figura 4.4**). Si el desensamblaje de los condensados fuera causado por la reversión térmica, debería observarse sólo en las células expuestas al pulso de luz roja seguido de oscuridad, donde la reversión permanece activa. Por el contrario, si el desensamblaje ocurre también bajo luz roja continua, esto indicaría que la temperatura afecta directamente la estabilidad de los condensados,

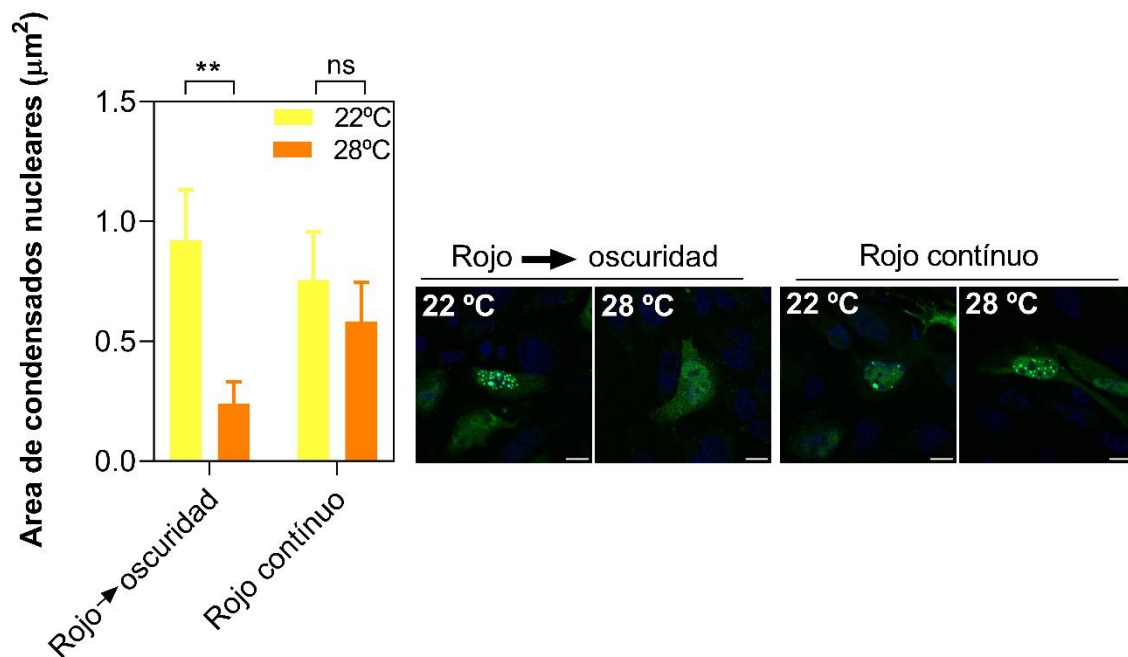


Figura 4.4. Tratamiento con rojo continuo diluye el efecto de la reversión térmica de phyB en células de mamíferos. Área de los condensados nucleares de phyB en células de mamífero CHO-K1 observadas por microscopía confocal luego de un pulso de 15 minutos de luz roja seguido de oscuridad a 22 °C o 28 °C (**Rojo → oscuridad**) y de rojo continuo a 22 °C o 28 °C (**Rojo continuo**). Las células fueron transfectadas con los plásmidos *p40S:phyB-eGFP* + *p40S:PIF3-eCerulean* (**phyB/PIF3**). Los valores graficados corresponden al promedio ± EE de 8-10 réplicas biológicas realizadas en dos experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a comparación de medias mediante la prueba pareada de t.

independientemente del estado de phyB como Pr-Pr o Pfr-Pfr (hipótesis propuesta por Chen *et al.*, 2022).

Se observó que los condensados sólo se desensamblan en las células tratadas con un pulso de luz roja seguido de oscuridad y 28 °C. En cambio, en las células tratadas con luz roja continua y 22 °C o 28 °C se observó que los condensados son del mismo tamaño (**Figura 4.4**).

Estos resultados muestran que el desensamblaje de los condensados en temperaturas cálidas depende de la reversión térmica de phyB y no de un efecto directo de la temperatura sobre los condensados.

phyB recupera la formación de condensados en temperaturas muy altas

Dado que phyB puede realizar reversión térmica en células de mamíferos, a continuación, se realizaron experimentos que permitieran estudiar el comportamiento de phyB en temperaturas templadas, cálidas y muy altas. Para eso, se iluminó a las células con un pulso de luz roja seguido de oscuridad a 22 °C, 28 °C y 37 °C durante 30 minutos (**Figura 4.5**).

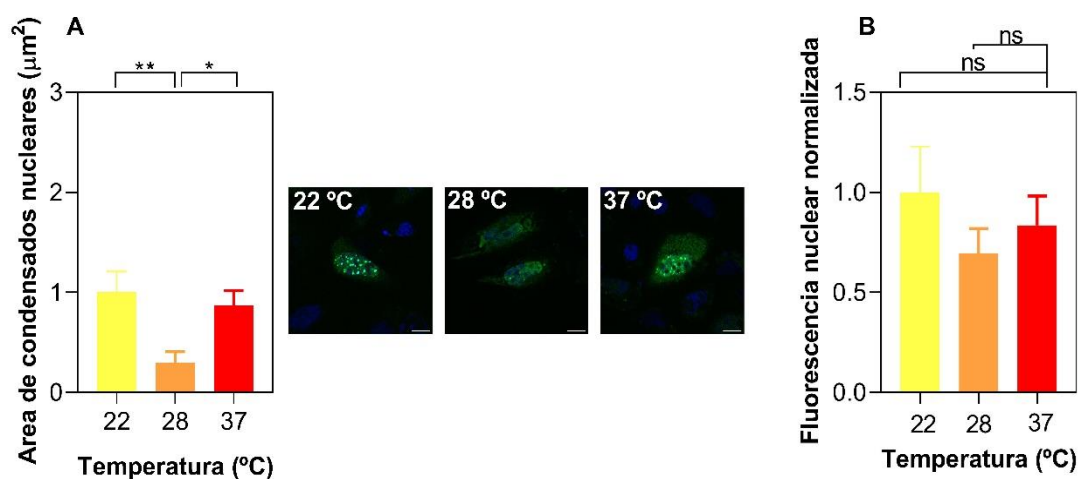


Figura 4.5. Los condensados nucleares de phyB también responden a los cambios en la temperatura en células de mamíferos. Área de los condensados nucleares de phyB (**A**) y fluorescencia nuclear normalizada (**B**) en células de mamífero CHO-K1 observadas por microscopía confocal luego de un pulso de 15 minutos de luz roja seguido de oscuridad a 22 °C, 28 °C o 37 °C. Los datos graficados en 22 °C son los mismos que en la figura 1.11. Las células fueron transfectadas con los plásmidos *p40S:phyB-eGFP* + *p40S:PIF3-eCerulean* (**phyB/PIF3**). Los valores graficados corresponden al promedio ± EE de 8-10 réplicas biológicas realizadas en dos experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a comparación de medias mediante la prueba pareada de t.

Se observó que el tamaño de los condensados de phyB dentro del núcleo es similar en 22 °C y 37 °C, pero que disminuyen significativamente cuando las células están en 28 °C (**Figura 4.5.A**). Sin embargo, a diferencia de los resultados en plantas, la intensidad total de la fluorescencia no cambió significativamente con la temperatura (**Figura 4.5.B**).

En conclusión, estos resultados muestran que en células de mamíferos se produce un aumento del tamaño de los condensados en temperaturas muy altas, al igual que lo observado en plantas, mostrado en la sección anterior. Pero, además, indican que, en plantas, esta capacidad no se debe sólo a un incremento en la cantidad de phyB, ya que, en el sistema ortogonal, los condensados también aumentan a 37 °C sin presentar cambios en los niveles totales de proteína.

Los experimentos de esta sección se realizaron coexpresando phyB con PIF3, por lo cual una posibilidad es que el aumento del tamaño de los condensados de phyB podría ser consecuencia de un incremento en la proteína PIF3. Alternativamente, esta respuesta podría ser una propiedad intrínseca de los condensados en temperaturas muy altas o un efecto relacionado con la disminución de la reversión térmica de phyB a 37 °C, lo que favorecería la acumulación de phyB en estado Pfr-Pfr y su agregación en condensados.

Capítulo

5

**La supervivencia de las plantas en
temperaturas muy altas requiere de
ELF₃**



La dinámica nuclear de ELF3 no explica la inhibición del crecimiento en temperaturas muy altas

Al igual que *phyB*, *ELF3* es también un sensor de temperatura y un inhibidor del crecimiento (**Figura 1**). Como se mencionó en la introducción, la actividad de *ELF3* está relacionada con su capacidad represora del crecimiento en temperaturas templadas, mientras que las cálidas disminuyen la actividad de *ELF3* (Mizuno *et al.*, 2014, Box *et al.*, 2015, Murcia *et al.*, 2022). Para explorar si cumple una función en la inhibición del crecimiento en temperaturas muy altas, en este capítulo se estudió a *ELF3*.

El impacto inhibitorio de *ELF3* aumenta en temperaturas muy altas

Usando los datos de actividad del promotor de *PIF4* en plantas salvajes y en plantas mutantes nulas *elf3* (**Figura 3.15**), se calculó el impacto inhibitorio del gen *ELF3* y, además, se utilizaron plantas mutantes *elf3* para calcular el impacto inhibitorio sobre el crecimiento del hipocotilo plantas salvajes de la misma forma que se hizo para los mutantes en las secciones anteriores (**Figura 5.1**).

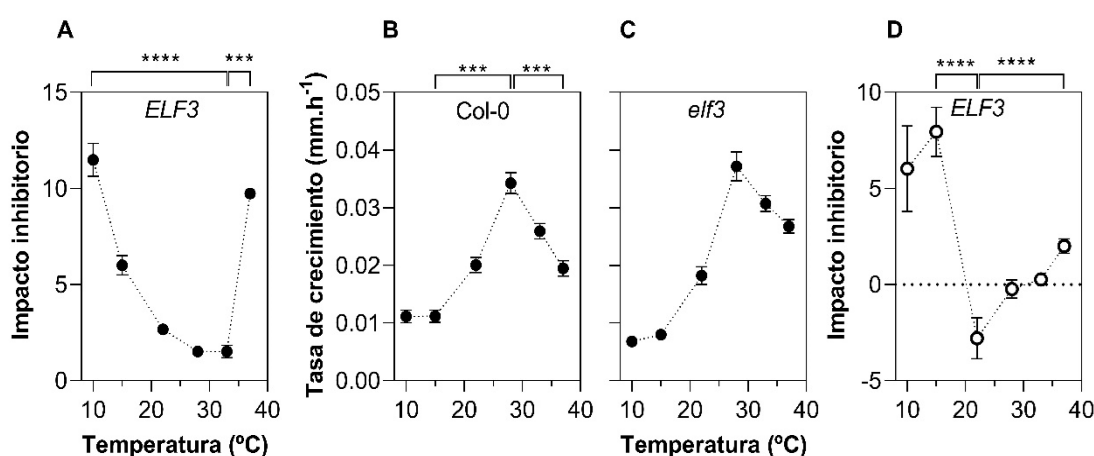


Figura 5.1. El impacto inhibitorio de *ELF3* aumenta en temperaturas muy altas. Impacto de *ELF3* en actividad del promotor *pPIF4* calculado a partir de los valores de la figura 3.13 (A), tasa de crecimiento del hipocotilo en plantas de genotipo salvaje (Col-0) repetidos de la figura 2.2, para mejor comparación con la mutante (A), *elf3* (B) y el impacto inhibitorio de *ELF3* calculado a partir de los datos de crecimiento del hipocotilo de las plantas mutantes con respecto a plantas Col-0 (C). Todas las plantas fueron tratadas durante 4 horas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C o 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de doce réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo sobre el cálculo del efecto inhibitorio. En A, entre 28 °C y 37 °C, y en D, entre 10 °C y 22 °C, se realizó un ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák; el resto corresponde a una regresión lineal.

En ambos casos, a pesar de diferencias en la temperatura en que se observó el mínimo, el efecto inhibitorio de ELF3 cayó con la temperatura y esta tendencia se revierte a temperaturas muy altas (**Figura 5.1**).

La abundancia nuclear de ELF3 disminuye en temperaturas muy altas

Las temperaturas cálidas, en comparación con temperaturas templadas, aumentan los niveles de proteína de ELF3 (Ding *et al*; 2018). Para caracterizar la abundancia de ELF3 en todo el rango de temperaturas, se utilizaron las líneas reporteras ELF3-LUC y ELF3-YFP, para cuantificar por luminómetro y por microscopía confocal, respectivamente, luego de 4 y 8 horas de tratamiento de temperatura (**Figura 5.2**).

Los resultados de microscopía confocal muestran que la fluorescencia de ELF3-YFP en células del hipocótilo, luego de 4 horas de temperatura, aumentó entre 10 - 28 °C y disminuyó entre 28 - 37 °C, alcanzando los mismos niveles de fluorescencia que a 22 °C (**Figura 5.2.A**). A las 8 horas el patrón de respuesta fue similar pero más pronunciado, alcanzando a 37 °C los mismos niveles de fluorescencia que a 10 °C (**Figura 5.2.B**).

La señal de luminiscencia de ELF3-LUC aumentó entre 10 - 33 °C y disminuyó en 37 °C (**Figura 4.2.C**, control positivo **Figura anexo 2**). La medición por luminiscencia a las 8 horas no se pudo realizar porque la luciferina se degradó. Además, se midió la luminiscencia de *pELF3:LUC* (**Figura 5.2.D**) para analizar si pudiese haber cambios en la expresión. Se observa el aumento entre 10 - 22 °C y la disminución entre 22 - 37 °C (**Figura 5.2.D**), sugiriendo que la actividad del promotor de ELF3 es más alta en temperaturas frías y templadas que en temperaturas cálidas y muy altas.

En trabajos previos de nuestro grupo se observó que temperaturas cálidas aumentan la abundancia de ELF3 pero disminuyen su actividad (Murcia *et al.*, 2022). Los resultados de esta tesis también muestran que la cantidad de ELF3-YFP aumenta en temperaturas cálidas y que, además, disminuye en temperaturas muy altas, aunque su impacto inhibitorio aumenta. Por lo tanto, una interpretación que se desprende de

los datos mostrados aquí es que la actividad de ELF3 se recupera en temperaturas muy altas.

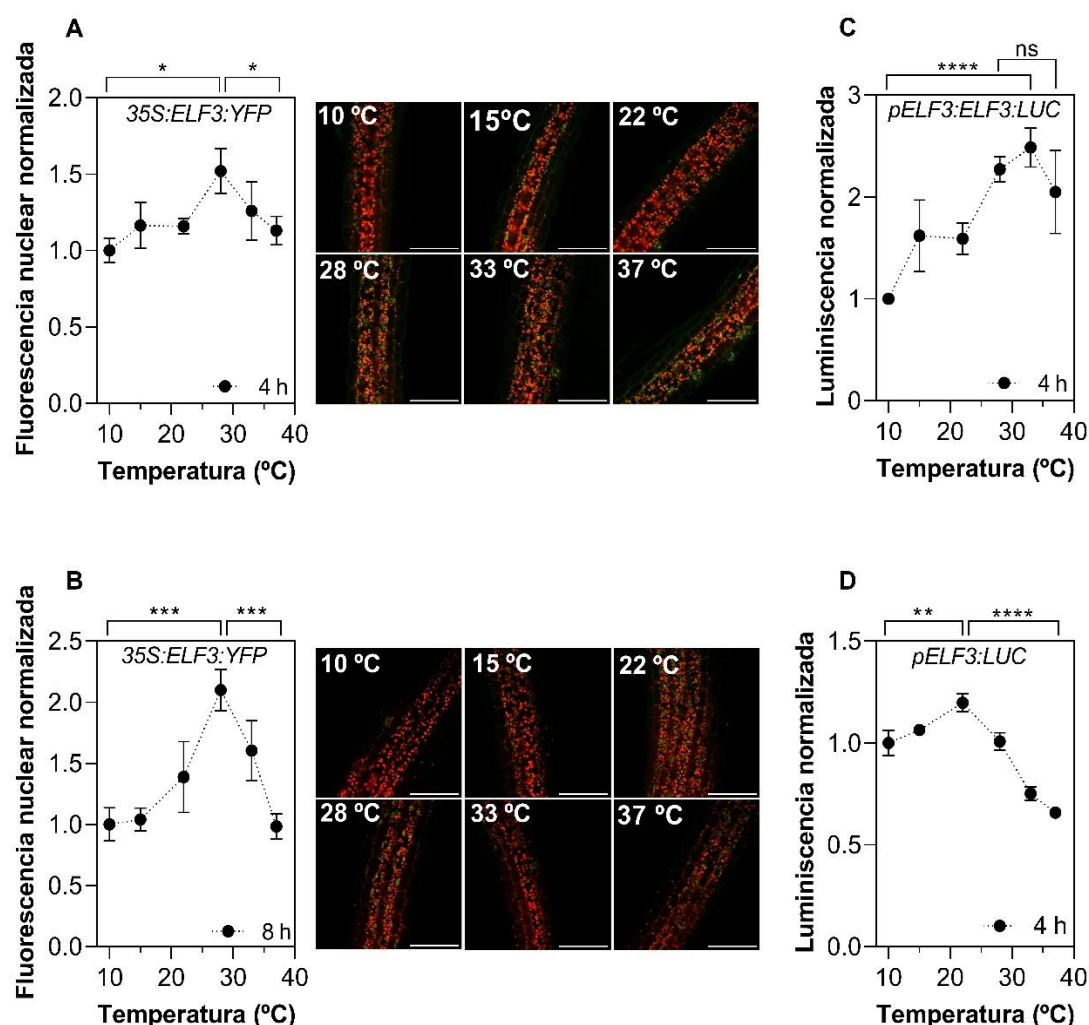


Figura 5.2. La fluorescencia de ELF-YFP disminuye en temperaturas muy altas. Intensidad de fluorescencia nuclear de *35S:ELF3:YFP* en células del hipocotilo luego de 4 horas de tratamiento de temperatura a 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C o 37 °C (A) y de 8 horas de tratamiento de las mismas temperaturas (B), luminiscencia de plantas *pELF3:ELF3:LUC* (C) y *pELF3:LUC* (D), también tratadas con temperatura durante 4 horas. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 10-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes en microscopía y de cuatro réplicas biológicas hechas en cuatro experimentos independientes en luminómetro. Todos los valores están normalizados a 10 °C. Análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes, excepto para *pELF3:ELF3:LUC* para el que se realizó un ANOVA seguido de la comparación señalada entre corchetes usando la prueba Holm-Šidák.

La cantidad de ELF3 libre en el nucleosoma disminuye en temperaturas muy altas

Al igual de phyB, ELF3 forma condensados nucleares que están presumiblemente relacionados con la actividad. Pero su interpretación no es sencilla,

ya que en células del hipocotilo de *Arabidopsis* las temperaturas cálidas pueden promover o inhibir la formación de condensados (Jung *et al.*, 2020, Murcia *et al.*, 2022; Ronald *et al.*, 2021), como se explica en detalle en la introducción. Para estudiarlos en todas las temperaturas se procedió de la misma forma que para los condensados de phyB (**Figura 5.3**).

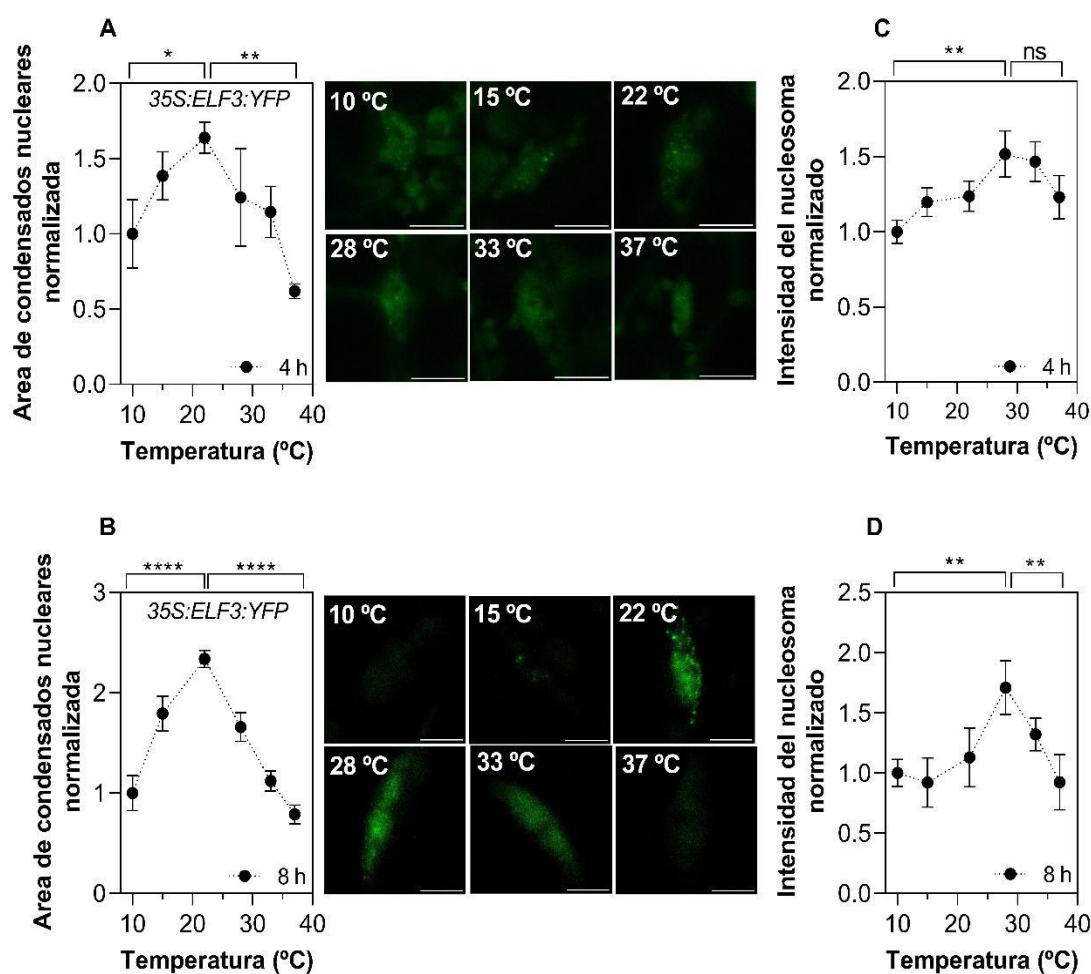


Figura 5.3. En temperaturas muy altas los condensados de ELF3 se desarman y la cantidad de ELF3 libre disminuye. Área de los condensados nucleares en células del hipocótilo en plantas de la línea 35S:ELF3:YFP tratadas con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C a las 4 horas (A) y a las 8 horas (B). A los valores de fluorescencia nuclear se les restó el valor integral de la fluorescencia, cantidad y área de los condensados para obtener la fluorescencia del nucleoplasma a las 4 horas (C) y a las 8 horas (D). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 10-12 réplicas biológicas realizadas en tres experimentos independientes para las cuales se tomó el promedio de 5 núcleos por planta. Todos los valores están normalizados a 10 °C. El análisis estadístico corresponde a regresión lineal analizado en el rango indicado dentro de los corchetes.

La temperatura tuvo una influencia clara y consistente en la formación o desensamblado de condensados de ELF3. Luego de 4 horas de tratamiento, se observó

que el tamaño de los condensados aumentó entre 10 - 22 °C y disminuyó entre 22 - 37 °C, infiriendo que en temperaturas muy altas se desensamblan o bien no se forman (**Figura 5.3.A**). A las 8 horas de tratamiento los condensados se observaron mejor en todas las condiciones debido que al final del día *ELF3* se expresa más, pero el patrón de respuesta a la temperatura fue el mismo (**Figura 5.3.B**).

La relación entre el tamaño y cantidad de los condensados de *ELF3* y su actividad se deja para la sección discusión. Pero, aunque se esperaba el aumento de actividad de *ELF3* en temperaturas muy altas, no es posible afirmar que esto esté sucediendo ya que en esas temperaturas hay condensados muy pequeños o directamente no hay. Por ello, para analizar la posibilidad de que a 37 °C haya un incremento en la cantidad de *ELF3* libre, presumiblemente activo, se utilizaron las fotografías de los núcleos para cuantificar, además del tamaño de los condensados, la fluorescencia total y la cantidad de condensados. Esta información se integró en lo que se denominó intensidad del nucleosoma para tener una cuantificación de *ELF3* libre y disponible en el núcleo (**Figuras 5.3.C y D**). A las 4 horas, se observó que la cantidad de *ELF3* en el nucleosoma aumentó entre 10 - 28 °C y disminuyó entre 28 - 37 °C. A las 8 horas, la disminución entre 28 - 37 °C fue más pronunciada a las 8 horas. Por lo tanto, dado que no hay *ELF3* libre en nucleosoma en temperaturas muy altas, no es posible afirmar que *ELF3* este más activo.

Hasta aquí los resultados muestran que temperaturas muy altas provocan la disminución en la abundancia de *ELF3* y que dentro del núcleo no hay *ELF3* libre ni formando condensados. Sin embargo, como su impacto inhibitorio aumenta, es posible que la actividad de *ELF3* no esté ocurriendo de manera directa o que no esté ocurriendo dentro del núcleo.

ELF3 se localiza en el citoplasma en temperaturas muy altas y es un componente que otorga termorresistencia

ELF3 forma agregados citoplasmáticos en temperaturas muy altas

Como se describió en la sección anterior, ELF3 forma unos condensados muy pequeños o directamente no forma condensados nucleares en temperaturas muy altas. Pero, al realizar los experimentos de microscopía confocal, se observó que ELF3 forma agregados muy brillantes por fuera del núcleo, únicamente en temperaturas muy altas. Para confirmar que no se trataban de condensados nucleares se realizaron experimentos en plantas fijadas luego de 4 y 8 horas de tratamiento, teñidas con DAPI para la correcta identificación de los núcleos (**Figura 5.4**).

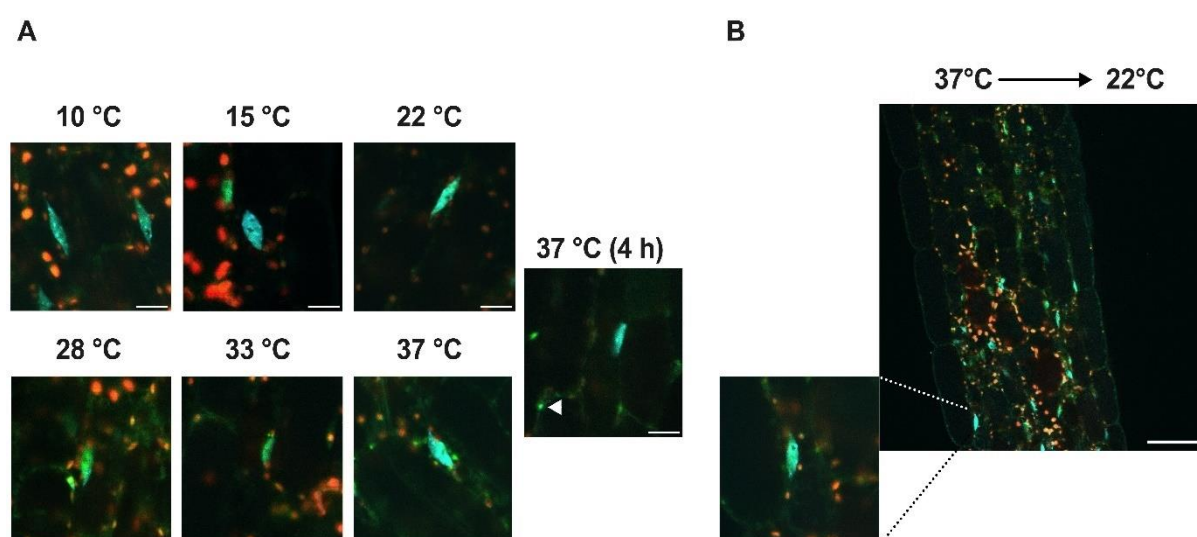


Figura 5.4. ELF3 forma agregados citoplasmáticos en temperaturas muy altas. Fotografías ampliadas de los núcleos por microscopía confocal de la línea *35S:ELF3:YFP* en plantas fijadas y teñidas con DAPI luego de 8 horas de tratamiento con las temperaturas 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C, 37 °C y 4 horas a 37 °C, donde se señalan los agregados citoplasmáticos (flechas blancas) (**A**), y fotografía de planta entera representativa de plantas tratadas a 37 °C durante 8 horas y recuperadas a 22 °C por 1 hora y ampliación de uno de sus núcleos (**B**).

Los agregados citoplasmáticos de ELF3-YFP sólo se observaron en temperaturas muy altas, siendo 37 °C donde hubo más acumulación y esto ocurrió tanto a las 4 horas de tratamiento como a las 8 horas (**Figura 5.4.A**). Además, se muestra que los agregados son estructuras dinámicas porque se desarmaron luego de transferir las plantas nuevamente a 22 °C luego de haber estado durante 8 horas a 37 °C (**Figura 5.4.B**).

También se observó que la señal de DAPI coincide con los agregados citoplasmáticos, sugiriendo que estos agregados contienen ácidos nucleicos (**Figura 5.5**).

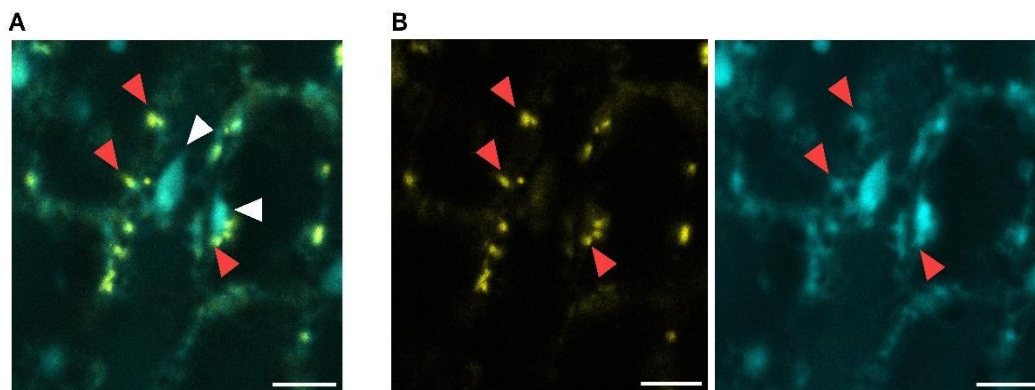


Figura 5.5. ELF3 forma agregados citoplasmáticos en temperaturas muy altas. Fotografías ampliadas de microscopía confocal de la línea *35S:ELF3:YFP* en plantas fijadas y teñidas con DAPI luego de 8 horas a 37°C (**A**). Se señalan los núcleos (flechas blancas) y los agregados citoplasmáticos (flechas rojas). Los canales que registran la fluorescencia YFP y de DAPI se muestran separados para notar que los condensados se superponen con la señal de DAPI que no corresponde al núcleo (**B**).

Las características de los condensados observados en el citoplasma coinciden con la de gránulos de estrés, organelas sin membrana que se forman por separación de fases líquido-líquido.

ELF3 es necesario para amortiguar el efecto estresante en temperaturas muy altas

La formación de agregados citoplasmáticos de ELF3-YFP en temperaturas muy altas, que podrían llegar a ser gránulos de estrés, sugiere que ELF3 pueda participar en la respuesta al estrés. Para explorarlo, se realizaron ensayos de supervivencia con plantas de genotipo salvaje y distintos alelos de plantas de genotipo mutante *elf3*. El ensayo consistió en someter a las plantas a 37 °C durante 8 horas y luego se las dejó recuperar durante 24 horas a 22 °C (**Figura 5.6**).

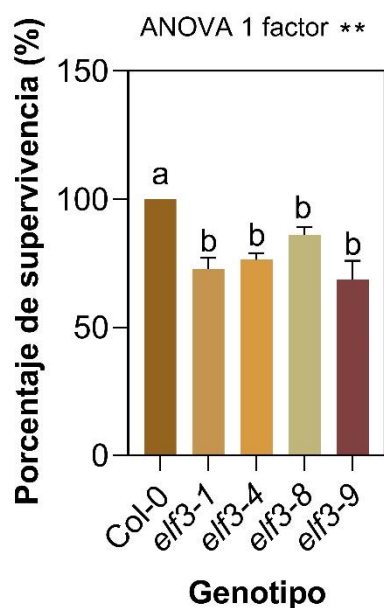


Figura 5.6. Las plantas mutantes *elf3* tienen menor supervivencia que plantas de genotipo salvaje. Porcentaje de plantas supervivientes de genotipo salvaje (Col-0) y distintos alelos mutantes pérdida de función *elf3*, luego de ser sometidas a 37 °C durante 8 horas y luego recuperadas a 22 °C por 24 horas. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 4 réplicas biológicas realizadas en dos experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a ANOVA de un factor con comparaciones mediante la prueba de Dunnet. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre combinaciones de genotipo y condición de luz

Las plantas mutantes de *elf3* mostraron menor supervivencia que las plantas salvajes (**Figura 5.6**). Estas plantas no son más sensibles que las de genotipo salvaje ya que a 22 °C no se observó diferencias en la tasa de mortalidad de las plantas (**Figura anexo 3.A**). Este ensayo también se realizó para plantas mutantes de *phyB* y de *pif7* donde no se observaron diferencias entre las mutantes y plantas salvajes (**Figuras anexo 3.B y C**).

Por último, el aumento de temperatura hacia el rango de temperaturas estresantes está vinculado con el aumento de ROS, como se observó en los resultados del meta-análisis (**Figura 1.2**). Como ELF3 otorga resistencia a las altas temperaturas, se decidió explorar la posibilidad de que ELF3 este regulando la cantidad de ROS. Para eso se utilizó una tinción que precipita con la presencia de O $\cdot$ dando un color azul, en plantas mutantes *elf3* y en plantas salvajes (**Figura 5.7**).

Los resultados muestran que las plantas *elf3* presentaron niveles más altos de O $\cdot$ en todas las temperaturas que las plantas salvajes (**Figura 5.7**).

En conjunto, los resultados de esta sección muestran que ELF3 otorga una función de termotolerancia a las plantas, que podría estar vinculado a la formación de gránulos de estrés en el citoplasma y con la disminución de ROS en las células que en consecuencia ayudarían a la supervivencia de las plantas en las condiciones adversas de temperaturas muy altas.

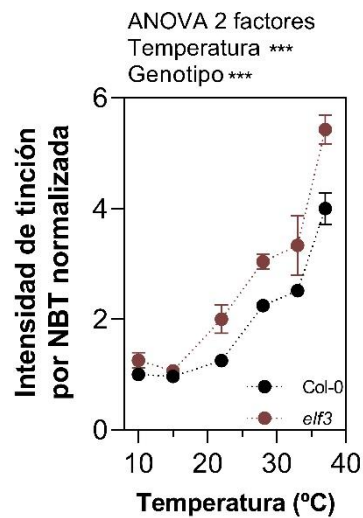


Figura 5.7. Plantas mutantes *elf3* tienen mayor cantidad de ROS. Intensidad de NBT, que indica la presencia del ión superóxido $O_2^{\cdot-}$, en cotiledones de plantas de genotipo salvaje (Col-0) y *elf3*, luego de 4 horas de tratamiento con las temperaturas 10°C, 15°C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 4 réplicas biológicas realizadas en dos experimentos independientes. Análisis estadístico corresponde a ANOVA de dos factores, señalando el efecto principal de *elf3*.

Discusión

Discusión

1. Las temperaturas muy altas reducen los niveles de auxina, hormona necesaria para el crecimiento

El meta-análisis realizado en este trabajo es el primer análisis disponible en la literatura (Bianchimano-De Luca *et al.*, 2024) que compara la expresión de los genes en todo el rango de temperatura que permite el crecimiento (al menos transitoriamente) de *Arabidopsis thaliana*. Dado que el análisis implica la variabilidad inherente a la combinación de datos de diferentes condiciones experimentales, tiene poca sensibilidad a las respuestas específicas del contexto, pero, por las mismas razones, produce una lista de genes que muestran cambios robustos a la temperatura.

Como no todos los genes son expresados o reprimidos en las mismas temperaturas (**Figura 1.1**), una primera conclusión evidente es que los cambios en distintos rangos de temperatura generan efectos específicos en el transcriptoma de respuesta rápida (dentro de las 24 horas) para atenuar los numerosos efectos negativos que tienen temperaturas extremas, aclimatarse o incluso aprovechar las condiciones óptimas. A continuación, se discuten los cambios principales por temperatura:

1. Las temperaturas templadas favorecen la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis y el desarrollo de órganos (**Figura 1.2**), funciones fundamentales que son favorecidas cuando las plantas están creciendo en condiciones óptimas (Hikosaka *et al.*, 2006, Romero-Montepaone *et al.*, 2021).
2. Las temperaturas cálidas favorecen la expresión de genes relacionados con el crecimiento celular y las hormonas auxinas y brasinoesteroides (**Figura 1.2**), de manera consistente con el efecto que tienen las temperaturas cálidas sobre la promoción del crecimiento a través del aumento de estas hormonas (Gray *et al.*, 1998, Stavang *et al.*, 2009, Bellstaedt *et al.*, 2019, Costigliolo-Rojas *et al.*, 2022, Maharjan *et al.*, 2011, Ibañez *et al.*, 2018). En particular, los genes más importantes de la síntesis y señalización de las auxinas aumentaron su expresión, como *YUC8*, *IAA19* y *SAUR20-24* (**Figura 1.4**). Sin embargo, no todos los genes vinculados a auxinas siguieron el mismo patrón ya que algunos genes disminuyeron su expresión, como familias de genes transportadores

como *ABCB* y *PIN*, de genes que conjugan las auxinas con aminoácidos para inactivarlas y regular su abundancia en las células, como *GH3* e *ILLs*, y genes de síntesis como los *YUCAs*. Incluso, en otros casos la expresión no cambia con respecto a las templadas. Cabe la posibilidad de que se trate de retroalimentaciones negativas entre el transporte y la síntesis de auxina. Por otra parte, también estas temperaturas favorecen la expresión de genes que codifican cambios en la luz roja y roja lejana (**Figura 1.2**), que son cambios lumínicos característicos de las plantas sometidas en sombra y que apoyan la convergencia ya estudiada entre temperaturas cálidas y sombra (Romero-Montepaone *et al.*, 2021). Finalmente, genes vinculados a los procesos metabólicos de lípidos y ácidos grasos (**Figura 1.2**) y esto coincide con cambios en la composición de ácidos grasos como estrategia de la planta para ajustar la fluidez de sus membranas en temperaturas cálidas (Falcone *et al.*, 2004).

3. Las temperaturas muy altas favorecen la expresión de genes relacionados con la respuesta redox y mecanismos de protección celular, de acuerdo con lo esperado en condiciones de estrés térmico (Dündar *et al.*, 2024; Kodak *et al.*, 2007) (**Figura 1.2**). Además, aparece la respuesta a la privación del agua (**Figura 1.2**) que también es esperada porque las temperaturas muy elevadas suelen ir acompañadas de la sequía (Janni *et al.*, 2024). También aparece la respuesta de regulación negativa de la fotosíntesis (**Figura 1.2**), que se sabe que disminuye en temperaturas muy altas (Hikosaka *et al.*, 2006) y de plegamiento de proteínas (**Figura 1.2**), ya reportado previamente (Alvarez-Ponce *et al.*, 2018). También favorecen la expresión de genes que no han sido previamente reportados en la regulación de la respuesta a temperaturas altas, pero que por su naturaleza resulta interesante que sean regulados en este contexto, como los relacionados con el ácido abscísico (**Figura 1.2**), una hormona que, al ser aplicada exógenamente, inhibe el crecimiento de las plantas (Emenecker *et al.*, 2023, Xu & Zhu, 2020), y las giberelinas (**Figura 1.2**), que son necesarias para el crecimiento a temperaturas cálidas (Stavang *et al.*, 2009). Además, inhiben la expresión de la mayoría de los genes de la vía de las auxinas, que no fue reportado previamente (**Figura 1.4**).
4. Las temperaturas frías regulan genes relacionados con la aclimatación, regulación del crecimiento y del desarrollo de órganos y tejidos (**Figura 1.2**), todas respuestas esperadas (Catalá *et al.*, 2011, Wanner *et al.*, 1999) y también

con el ácido abscísico (**Figura 1.2**). Además, las temperaturas frías no tienen un efecto general ni consistente sobre la misma familia de genes de las auxinas (**Figura 1.4**).

Hay varios resultados interesantes del meta-análisis, como la categoría de genes de regulación del ácido abscísico y de las giberelinas, que, en consonancia con lo descrito en los párrafos anteriores, puede estar relacionada con la inhibición del crecimiento que ocurre cuando las plantas están expuestas a temperaturas muy altas (**Figura 1.3**). La participación del ácido abscísico está siendo estudiada actualmente y en esta tesis se presenta sólo un avance que muestra que los genes de la síntesis de ácido abscísico son necesarios para efectuar la correcta inhibición del crecimiento, ya que si no están presentes la transición en el efecto promotor e inhibitorio se ve retrasada (**Figura 3.3**). En cambio, esta tesis se centró en la vía de las auxinas y su participación en la regulación del crecimiento en temperaturas muy altas.

Los datos obtenidos en *Arabidopsis* respaldan la hipótesis de que las auxinas disminuyen a temperaturas muy altas. Esta conclusión se apoya en diversos resultados experimentales que muestran reducciones consistentes en múltiples componentes de la vía de señalización de auxinas:

1. La expresión de genes de las auxinas disminuye (resultado del meta-análisis, **Figuras 1.3 y 1.4**).
2. Los niveles de auxinas disminuyen, según se observó por FRET y absorbancia (**Figuras 2.1**).
3. Disminuyen componentes de distintos pasos de la vía de señalización de auxinas, como el del reportero DII-VENUS (**Figura 2.2.A**), que muestra la disminución de los correceptores Aux/IAAs, es decir al principio de la vía de señalización, y de DR5-GPF (**Figuras 2.2.B y C**), que muestra menor actividad transcripcional de los genes *ARFs*, casi al final de la vía de señalización.
4. Disminuye la abundancia de ARF6-GFP (**Figura 2.3.B**), que está en un paso intermedio entre los del punto 3.
5. Disminuye la abundancia del receptor de auxinas, según se observa en el reportero TIR1-mCitrina (**Figura 2.3.A**).
6. Aumento del pH en el apoplasto (más alcalino), según se observa en el reportero Apo-pHluorin (**Figura 2.4**).

7. Por último, el análisis genético con plantas mutantes en genes de la síntesis y la vía de auxinas muestra que los genes analizados (*SAV3*, *YUC* y *SAUR*) son necesarios para que las plantas respondan al estímulo inhibitorio de las temperaturas muy altas (**Figura 2.5**). Vinculado a la disminución de la expresión de los genes de auxinas, indica que la cantidad de auxinas no aumentó lo suficiente como para promover el crecimiento.

Además, en el trabajo de Wang *et al.*, (2024) se reporta que el aumento de la expresión de los genes *SAUR* induce la activación de las AHAs, lo que provoca acidificación del apoplasto que permite la flexibilización de la pared celular para la elongación. Por lo tanto, si la expresión de los genes *SAUR* disminuye se esperaría un aumento del pH del apoplasto, que generaría la reducción del crecimiento del hipocotilo, y estos resultados se observaron en el meta-análisis (**Figura 1.4**) y en la medición del pH del apoplasto (**Figura 2.3.A**).

La correlación entre el crecimiento de *Arabidopsis* en todo el rango de temperaturas y los niveles de auxinas, así como de los componentes de señalización de las auxinas, plantea la fuerte posibilidad de la cantidad de auxinas presente en la planta que este regulando no sólo la promoción del crecimiento (Stavang *et al.*, 2009, De Wit *et al.*, 2014) sino también la inhibición. Estos resultados resaltan el papel central de las auxinas como nodos reguladores que integran las señales de distintas temperaturas para modular el crecimiento.

2. Las temperaturas muy altas reducen los niveles de PIF4, factor de transcripción necesario para la síntesis de auxina en los cotiledones

El aumento de auxinas en temperaturas cálidas ocurre principalmente mediante la activación de los factores de transcripción PIF4 y PIF7, que regulan la expresión de genes de síntesis y respuesta a auxinas (Franklin *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2012, Leivar & Quial, 2011, Fiorucci *et al.*, 2020, Chung *et al.*, 2020). Sin embargo, en condiciones de temperaturas muy altas, se han observado cambios en PIF4 que podrían explicar la caída en los niveles de auxinas observada en estas condiciones. En cambio, en esas condiciones, la evidencia sugiere que PIF7 no participa de manera significativa en la regulación de auxinas.

Los cotiledones son órganos clave para la producción de auxinas (Chandler, 2008, Bellstaedt *et al.*, 2019, Procko *et al.*, 2014) que luego se transportan hacia el

hipocotilo a través del floema (Procko *et al.*, 2014, Bellstaedt *et al.*, 2019), muestran una disminución en la abundancia de PIF4 cuando las plantas son expuestas a temperaturas muy altas (**Figuras 3.7 – 3.9**). Como PIF4 promueve la expresión de genes de síntesis de auxinas, esta disminución podría explicar la reducción de auxinas discutida en la sección 1. En cambio, aunque en los hipocotilos la cantidad de PIF4 continúa aumentando en temperaturas muy altas (**Figuras 3.8 y 3.9**), el impacto genético promotor de *PIF4* disminuye (**Figura 3.2**). Como HY5 regula negativamente a PIF4 (Toledo-Ortiz *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2021) y aumenta en temperaturas muy altas en los núcleos de las células del hipocotilo (**Figura 3.13**), podría estar inhibiendo la actividad de PIF4. Por otra parte, BES1, que se localiza en células del hipocotilo en temperaturas cálidas (Costigliolo-Rojas *et al.*, 2022) y regula positivamente la acumulación de PIF4 (Bernardo-Garcia *et al.*, 2014, Martinez *et al.*, 2018, Wu *et al.*, 2019), aumenta en temperaturas muy altas la actividad del gen *BES1* y la abundancia de la proteína (**Figuras 3.2 y 3.12**). Con lo cual, podría haber un balance entre los efectos opuestos de HY5 y BES1 sobre PIF4 que determine la respuesta en los hipocotilos.

Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que PIF7 no está participando de la regulación del crecimiento en temperaturas muy altas. Si bien el impacto genético promotor disminuye (**Figura 3.2**), la abundancia de PIF7 aumenta (**Figura 3.11**). La reducción en su impacto sobre el crecimiento no implica necesariamente una menor actividad del gen, ya que su efecto podría darse de manera indirecta, a través de la modificación de otros genes. En este sentido, la disminución del impacto de *PIF7* podría deberse a genes secundarios afectados en plantas mutantes de *pif7*. En segundo lugar, la función de PIF7 podría estar limitada por PIF4, con quien interactúa formando heterodímeros (Kidokoro *et al.*, 2009, Chung *et al.*, 2020, Fiorucci *et al.*, 2020). Un trabajo previo muestra que en temperaturas cálidas PIF7 se une a los sitios blanco de los genes *YUC8* y *SAUR* pero no activa la expresión génica, sugiriendo que PIF7 requiere de otros factores para promover la transcripción, y se propone como posible explicación que la heterodimerización entre PIF4 y PIF7 desempeñe un papel clave en este proceso (Burko *et al.*, 2022). Por lo tanto, aunque la abundancia de PIF7 aumente en temperaturas muy altas, la disminución de PIF4 en los cotiledones podría cambiar la actividad de PIF7, limitando la expresión de los genes de auxinas. Finalmente, la actividad de PIF7 también es controlada a través de la fosforilación de phyB, que genera la acumulación de PIF7 inactivo (Leivar *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2012).

En ese escenario, el aumento de PIF7 en temperaturas muy altas no implicaría necesariamente que PIF7 este activo, ya que posiblemente este siendo fosforilado por las cantidades crecientes de phyB. Por lo tanto, es posible que los distintos mecanismos de phyB y PIF4 controlen la actividad de PIF7 en temperaturas muy altas. Por otro lado, es interesante mencionar que la estabilidad del *hairpin* 5' de PIF7, que es sensible a la temperatura, es estable hasta 32 °C. Si bien no se estudió la estabilidad en temperaturas más altas, se midió la traducción *in vitro* del *hairpin* y se observó que aumenta entre 27 - 32 °C y disminuye en 37 °C, volviendo a los mismos niveles que a 27 °C (Chung *et al.*, 2020). Como los experimentos en plantas mostrados en esta tesis muestran que PIF7 sigue aumentando su transcripción y traducción (**Figura 3.11**) en temperaturas muy altas, los mecanismos en las plantas podrían ser distintos, favoreciendo la traducción de PIF7.

Los otros PIFs analizados genéticamente, PIF3 y PIF5, mostraron evidencias de participar en la inhibición del crecimiento (**Figura 3.2**) pero queda pendiente analizarlos para determinar si son susceptibles a los cambios en la temperatura. Como evidencia extra, PIF3, al igual que PIF4, aparecen dentro del término ontológico de “respuesta a auxina”, que aumentan su expresión en temperaturas cálidas y la disminuyen en temperaturas muy altas (**Figura 1.3**), lo que favorece la posibilidad que PIF3 esté involucrado en disminución de las auxinas en dichas temperaturas.

En condiciones de temperatura templada, el sensor de temperatura phyB regula negativamente la abundancia de PIF4 a través de su fosforilación y posterior degradación en el proteasoma (Park *et al.*, 2018, Chen *et al.*, 2022). Por lo tanto, la reducción en la actividad promotora de PIF4 y en sus niveles proteicos observada a temperaturas muy altas podría estar reflejando una recuperación de la capacidad inhibitoria de phyB sobre PIF4.

3. Las temperaturas muy altas aumentan el impacto inhibitorio de phyB, su abundancia nuclear y condensación

En condiciones de temperatura muy alta, los resultados presentados en este trabajo revelan cambios en phyB que podrían representar eventos iniciales clave en la vía que conduce a la inhibición del crecimiento mediada por auxinas.

En primer lugar, se observa que el impacto genético inhibitorio de *PHYB* aumenta nuevamente en temperaturas muy altas, revirtiendo la disminución

registrada en temperaturas cálidas (**Figura 3.1**). Este comportamiento es consistente con la hipótesis planteada en la sección 2, según la cual phyB recuperaría su actividad inhibitoria sobre PIF4 en estas condiciones. Una explicación posible para este aumento en la actividad es el aumento en la cantidad de proteína nuclear que tiene phyB en temperaturas muy altas (**Figura 3.4 y 3.5**) ya que una consecuencia lógica sería un aumento en la cantidad de la forma activa Pfr-Pfr.

Los datos muestran que el aumento de proteína no es el único cambio relevante. En condiciones de luz con proporción 1:1 de rojo y rojo lejano, y temperatura muy alta, se observa un aumento en el tamaño de los condensados (**Figura 3.5**), indicando que la temperatura muy alta también promueve la organización en condensados nucleares, donde phyB sostendría su actividad inhibitoria. Llamativamente, luego de un pulso de rojo lejano —que convierte Pfr-Pfr en Pr-Pr y debería desarmar los condensados nucleares en el transcurso de una hora (Rausenberger *et al.*, 2010, Klose *et al.*, 2015)—, estos condensados persisten en temperaturas muy altas (**Figura 4.2**). Esto indicaría que, aunque el nivel de Pfr-Pfr disminuya tras el pulso como consecuencia de la fotoconversión, los condensados estarían estabilizando el Pfr-Pfr restante, prolongando su interacción con sus efectores (como PIF4). Esto es coherente con la inhibición del crecimiento observada en temperaturas muy altas tras un pulso de rojo lejano (**Figura 4.1**), porque indica que estas temperaturas prolongan la actividad de phyB incluso en condiciones de luz que normalmente la reducirían. Estos resultados son consistentes con datos previos que muestran que condiciones lumínicas que reducen el Pfr-Pfr a niveles mínimos siguen siendo capaces de inducir una respuesta en el crecimiento, lo que indica que incluso pequeñas cantidades Pfr-Pfr son funcionales (Casal & Mazzella, 1998).

En conjunto, los resultados indican que, aun en el caso que la reversión térmica disminuya los niveles de Pfr (Legris *et al.*, 2014, Jung *et al.*, 2014), la temperatura muy alta induce la acumulación del phyB en condensados nucleares estables que favorecerían la interacción de phyB con sus efectores, contribuyendo de esa forma a mantener su actividad inhibitoria, cumpliendo un rol clave en la disminución del crecimiento.

En resumen, el aumento en la temperatura por encima de las temperaturas cálidas genera el aumento en la cantidad de proteína de phyB, lo que generaría el

incremento de Pfr-Pfr, aunque se desconoce si este aumento es compensado (o no) por el aumento en la reversión térmica. Sea que haya más o menos Pfr-Pfr, lo que propongo como interpretación es que la cantidad de Pfr-Pfr remanente estabilizándose mantiene dentro de condensados nucleares, favoreciendo el tiempo de permanencia con los interactores de phyB. Este escenario es consistente con la recuperación de la actividad de phyB que se evidencia como recuperación del impacto inhibitorio, y con la disminución del impacto promotor de *PIF4* en temperaturas muy altas, la cantidad de proteína PIF4 en los cotiledones y la consecuente disminución en los niveles de auxinas.

4. Análisis del impacto de la temperatura en la separación de fases líquido-líquido para phyB y ELF3

Al ser condensados que se forman por separación de fases líquido-líquido son sensibles a cambios en la concentración (**Figura 3**). En el caso de phyB, en temperaturas frías, los condensados son pequeños (**Figura 3.4**), donde la concentración de phyB es baja (**Figuras 3.5 y 3.6**) y la cantidad de Pfr-Pfr es máxima (Legris *et al.*, 2014). Si esta concentración no alcanza los valores de saturación necesarios para la formación de condensados (**Figura 3**), esto puede explicar que no se estén formando, aunque la cantidad de Pfr-Pfr sea máxima. Por otro lado, en temperaturas cálidas los condensados también son pequeños, aunque hay más cantidad de proteína que en temperaturas templadas y frías. Sin embargo, las temperaturas cálidas aumentan la forma Pr, más estable y menos propensa a degradación que la forma Pfr-Pfr (Legris *et al.*, 2016), lo que puede explicar el incremento en la abundancia de phyB. En temperaturas muy altas los condensados son más grandes que en las otras temperaturas. Si bien se desconoce cuánto Pfr-Pfr hay, los resultados muestran que la cantidad de proteína de phyB está aumentando, con lo cual es posible que la separación de fases este favorecida e incluso fusionando los condensados existentes para dar lugar a condensados más grandes, siempre y cuando la cantidad de proteína no esté por encima del límite (porque eso generaría el efecto contrario, **Figura 3**). En conclusión, la formación de condensados nucleares de phyB no depende únicamente de la cantidad de Pfr-Pfr sino también de la cantidad de proteína y esto es importante tenerlo presente para no extrapolar de manera directa a los condensados con la actividad de phyB.

En el caso de ELF3, la temperatura muy alta desarma los condensados nucleares que se forman a través de su dominio PrD (Jung *et al.*, 2020) y esto es consistente con la menor cantidad de proteína nuclear que hay en esas condiciones (**Figura 5.2**). En temperaturas menores, donde ELF3 sí está dentro del núcleo, los condensados responden a cambios en la temperatura. El aumento en la temperatura favorece la cantidad de proteína, siendo en temperaturas cálidas donde la luminiscencia registrada para ELF3-LUC fue máxima (**Figura 5.3.C**). Sin embargo, la formación de los condensados de ELF3 se favorece hasta temperaturas templadas mientras que temperaturas cálidas se desarman (**Figura 5.3**). Si la cantidad de proteína presente está por encima del límite, es posible que la separación de fases se desfavorezca (**Figura 3**). Por otro lado, los cambios en los condensados observados entre temperaturas templadas y cálidas coinciden con los reportados en Ronald *et al.*, (2021), donde se propone que en los condensados ELF3 está transcripcionalmente activo e inhibiendo a sus genes diana. Por lo tanto, si el desensamblaje de los condensados disminuye la actividad inhibitoria de ELF3, tiene coherencia que en temperaturas cálidas se observe el crecimiento máximo (**Figura 5.1**). Sin embargo, como se menciona en la introducción, hay discrepancias en la literatura sobre la naturaleza de los condensados de ELF3. Jung *et al.*, (2020) muestra que los condensados sólo se forman en temperaturas cálidas (en contraste con los resultados de esta tesis) y sugieren que ELF3 estaría activo cuando está libre en el núcleo, mientras que los condensados serían focos que inhiben la acción de ELF3. En conclusión, la función de los condensados es algo que merece ser estudiado en mayor profundidad.

4. Funciones de ELF3 en plantas expuestas a temperaturas muy altas

En esta sección se discute la participación de ELF3 en la inhibición del crecimiento por altas temperaturas. Sin embargo, los datos aquí presentados sugieren que su comportamiento y localización subcelular podrían estar implicando una función más amplia.

La función de ELF3 en la inhibición del crecimiento en temperaturas muy altas se sustenta por el aumento de su impacto inhibitorio (**Figura 5.1**). La función inhibitoria de ELF3 ocurre, hasta donde se conoce, dentro del núcleo por inhibición de PIF4 (Box *et al.*, 2015, Nieto *et al.*, 2015) y de PIF7 (Jiang *et al.*, 2019). Sin embargo,

en temperaturas muy altas ELF3 no está dentro del núcleo, ni formando condensados ni libre en el nucleosoma (**Figura 5.3**). Debido a esto, no hay correlación entre el impacto inhibitorio de ELF3 y su localización nuclear. Sin embargo, esto no quiere decir que ELF3 no forme parte de los eventos de señalización involucrados en la disminución del crecimiento porque el impacto inhibitorio es calculado con mutantes *elf3*, y la ausencia de ELF3 en los mutantes podría desregular redes génicas compensatorias, alterando la expresión de factores que potencian su papel inhibitorio. Así, el aumento del impacto atribuido a ELF3 no necesariamente refleja una mayor actividad intrínseca, sino una cascada de señales genéticas dependientes de su contexto regulador. Además, debido a que ELF3 está localizado exclusivamente en el citoplasma en temperaturas muy altas, propongo como posibilidad que la función de ELF3 no esté limitada al núcleo. Una forma de analizar si ELF3 está activo en el citoplasma sería midiendo la actividad; por ejemplo, a través de la expresión del gen *LUX ARRHYTHMO* (*LUX*), porque ELF3 se une al promotor y reprime directamente su expresión (Nusinow *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2020, Ronald *et al.*, 2021).

Si bien no queda clara la funcionalidad de ELF3 sobre la inhibición del crecimiento, la formación de condensados citoplasmáticos en temperaturas muy altas es un fenómeno muy interesante que no se visualizó para ninguna otra proteína de este trabajo y que no fue previamente reportada para ELF3. Estos condensados citoplasmáticos presentan características distintivas que son consistentes con las características de los gránulos de estrés:

1. Se forman específicamente en condiciones de temperaturas muy altas y estresantes (**Figura 5.4**).
2. Son estructuras altamente dinámicas, dado que tras una hora de recuperación a temperatura templada desaparecen y ELF3 vuelve a localizarse en el núcleo de las células del hipocotilo (**Figura 5.4**).
3. Coinciden con la tinción de ácidos nucleicos, lo que sugiere la posible presencia de ARN en los condensados (**Figura 5.5**).

La hipótesis alternativa sería que los condensados fuesen cuerpos de procesamiento. Estas son estructuras menos dinámicas y están presentes en las células independientemente del estrés, pero su dinámica y movilidad podrían verse afectadas por diferentes condiciones ambientales como el estrés térmico, salino y el provocado por patógenos (Huang *et al.*, 2024, Kearly *et al.*, 2024). En líneas celulares humanas

se vio que el estrés oxidativo aumenta la formación *de novo* de los cuerpos de procesamiento (Kedersha *et al.*, 2005), y esto es relevante porque, como se mencionó en la sección 1 de la discusión, el aumento del estrés oxidativo es una consecuencia del estrés térmico en plantas, como se también se ve en el aumento de O₂⁻ en plantas salvajes (**Figura 5.6**). Además, los cuerpos de procesamiento también contienen ARN, aunque su función está relacionada a la degradación y no a la protección como en el caso de gránulos de estrés (Kim *et al.*, 2021). Por lo tanto, para confirmar la hipótesis sería necesario la utilización de marcadores típicos de gránulos de estrés, como UBP1b y PABP y de marcadores de cuerpos de procesamiento como DCP1 y DCP5 fusionados a fluoróforos que permitan estudiar la colocación de ELF3 con los marcadores por microscopía confocal (Kim *et al.*, 2021, Zhu *et al.*, 2022).

Para otras proteínas de Arabidopsis, la formación de gránulos de estrés fue asociada al aumento de la tolerancia a la temperatura y a la supervivencia (Zhu *et al.*, 2022, Allen & Strader, 2022). En esta tesis se mostró que la supervivencia de plantas mutantes de *elf3* disminuye en temperaturas muy altas (**Figura 5.6**), correlacionando con la formación de los gránulos de estrés, sugiriendo que los mecanismos están relacionados funcionalmente. Además, se ha identificado a ELF3 como uno de los genes candidatos en un locus de tolerancia al calor en plantas de trigo (Wang *et al.*, 2023), por lo que, si ELF3 otorga tolerancia a la temperatura, la variabilidad genética ya existente en especies cultivadas de interés agronómico podría afectar la tolerancia a las temperaturas muy altas. Sería interesante confirmarlo, analizando la supervivencia de plantas de trigo mutantes para el gen homólogo de ELF3.

Las temperaturas extremadamente altas incrementan los niveles de ROS debido al estrés oxidativo, lo que provoca daño en biomoléculas como clorofila, proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. Esto puede llevar a la muerte celular y afectar la fisiología y anatomía de las plantas, causando ralentización del crecimiento, mayor senescencia foliar y mayor susceptibilidad a enfermedades y plagas, lo que compromete su supervivencia (Baxter *et al.*, 2014, Fortunato *et al.*, 2023). Las plantas mutantes *elf3* mostraron niveles más altos que las plantas salvajes (**Figura 5.7**), sugiriendo que ELF3 estaría regulando la homeostasis de ROS. En la literatura, no hay ninguna relación funcional entre la formación de gránulos de estrés y ROS en plantas. Sin embargo, en el proteoma de gránulos de estrés, formados por estrés térmico en Arabidopsis, se identificaron proteínas involucradas en la mitigación del estrés

oxidativo (Kosmacz *et al.*, 2018), lo que sugiere que podrían tener actividad antioxidante. Esto ya se había observado en líneas celulares humanas (Takahashi *et al.*, 2013), por lo que la convergencia de la función no sería extraña. La tolerancia de las plantas al estrés oxidativo depende de la capacidad antioxidante de la células (Mittler *et al.*, 2002), por lo cual es razonable que los mecanismos descritos estén no sólo relacionados sino concatenados: (i) estrés térmico, (ii) detección de la temperatura por ELF3, (iii) formación de gránulos de estrés de ELF3 con proteínas mitigantes del estrés oxidativo y protección de ARNm, (iv) disminución de los niveles de ROS. En consecuencia, las plantas salvajes, con *ELF3* funcional, tienen mayor tolerancia al estrés térmico que plantas mutantes *elf3*.

En conjunto, los resultados de esta tesis proponen que ELF3 desempeña un doble rol en temperaturas muy altas: uno asociado a su función como represor del crecimiento y otro en la tolerancia al estrés térmico, relacionado con su localización citoplasmática y la formación de gránulos de estrés. La evidencia sugiere que los gránulos estarían contribuyendo a la tolerancia térmica mediante mecanismos que incluyen la mitigación del estrés oxidativo y posiblemente la protección del ARNm. Estas funciones no han sido previamente descritas para ELF3 y abren nuevas líneas de investigación sobre cómo esta proteína, a través de su dinámica subcelular, puede ayudar a las plantas a sobrevivir condiciones ambientales extremas. Comprender estos mecanismos no sólo es relevante desde un punto de vista básico, sino que podría tener implicancias aplicadas en cultivos sensibles al aumento de temperatura global.

Conclusiones

Conclusiones

En esta tesis se presentaron datos novedosos sobre el impacto del rango completo de temperaturas de crecimiento en *Arabidopsis thaliana*. Uno de los hallazgos fundamentales es que la inhibición del crecimiento inducida por altas temperaturas es un proceso activo, regulado por la planta, y no simplemente una consecuencia pasiva del deterioro celular. Un paso clave en el desarrollo de este trabajo fue la realización de un meta-análisis del transcriptoma de plantas expuestas a diferentes temperaturas, lo que permitió generar algunas hipótesis que fueron evaluadas experimentalmente.

Los resultados experimentales obtenidos muestran que la vía de las auxinas desempeña un papel central en la inhibición del crecimiento a temperaturas muy altas, afectando tanto su síntesis como su señalización. Este proceso involucra la recuperación de la actividad del termosensor phyB, que forma condensados nucleares en temperaturas muy altas que posiblemente estabilicen el Pfr disponible, favoreciendo su tiempo de permanencia con, por ejemplo, PIF4 (aunque posiblemente también de otros miembros de la familia PIFs). Esto generaría una cascada de señalización que disminuya la síntesis de auxinas en los cotiledones.

Por otro lado, se mostraron resultados novedosos sobre el termosensor ELF3, que es esencial para la supervivencia de las plantas en temperaturas muy altas. Este mecanismo requiere de la formación de condensados citoplasmáticos, posiblemente gránulos de estrés. Un esquema de los cambios principales se presenta en la **Figura 4**.

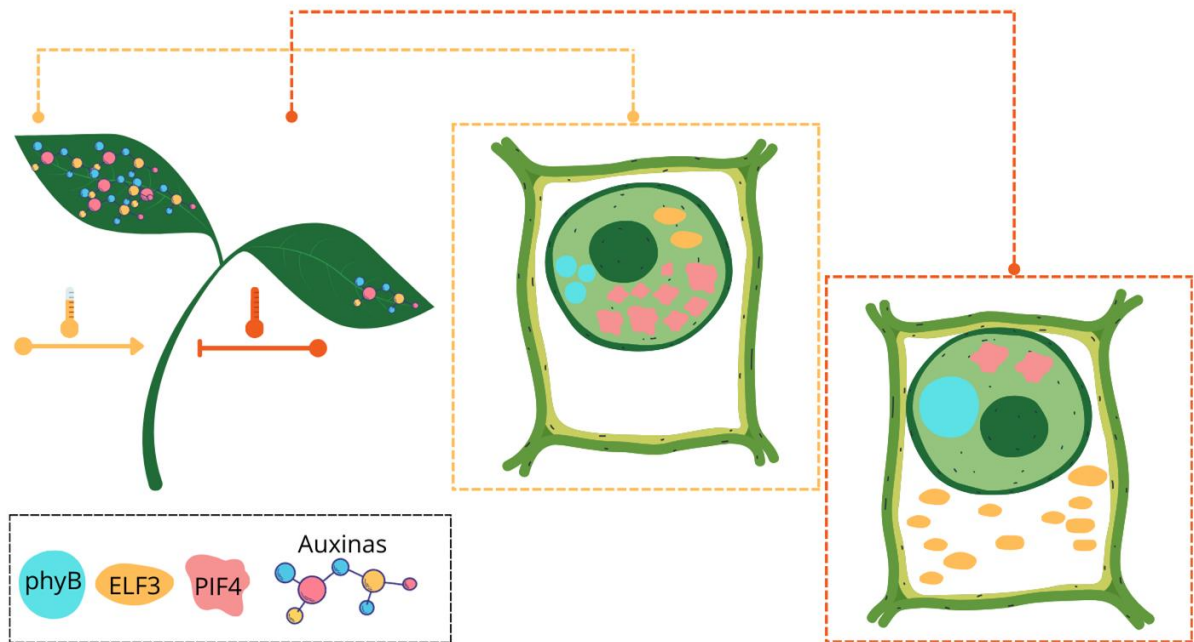


Figura 4. La temperatura controla el crecimiento del hipocotilo a través de la síntesis de auxinas. Esquema que abarca las diferencias entre temperatura cálida y muy alta a nivel celular. Comparativamente, temperaturas cálidas tienen menos phyB y ELF3 dentro del núcleo y, consecuentemente, más PIF4, que promueve la síntesis de auxinas y la elongación del hipocotilo. Temperaturas muy altas tienen más phyB dentro del núcleo, estabilizado dentro de condensados, y menos PIF4, lo que se traduce en menor síntesis de auxinas que se traslocan hacia el resto de la planta. En consecuencia, se inhibe la elongación del hipocotilo. Además, plantas sometidas a temperaturas muy altas tienen más ELF3, formando gránulos de estrés en el citoplasma, posiblemente regulando reacciones redox.

Las variaciones de temperatura, desde condiciones frías hasta muy altas, representan un desafío para las plantas, que desarrollaron diversos mecanismos de respuesta para atenuar sus efectos negativos. En temperaturas muy altas, la vía de percepción y señalización induce la inhibición del crecimiento, un mecanismo que podría favorecer la búsqueda de sombra a través de la proximidad con otras plantas y contribuir a la reducción de la temperatura en los órganos.

Bibliografía

Bibliografía

Agilent Technologies. Introduction to Quantitative PCR, *Methods and Applications Guide* (2012).

Adame-Arana, O., Weber, C. A., Zaburdaev, V., Prost, J., & Jülicher, F. (2020). Liquid phase separation controlled by pH. *Biophysical Journal*, 119(8), 1590-1605.

Alberti, S. (2020). The plant response to heat requires phase separation. *Article*.

Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2019). Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates. *Cell*, 176(3), 419-434.

Alvarez-Ponce, D., Ruiz-González, M. X., Vera-Sirera, F., Feyertag, F., Perez-Amador, M. A., & Fares, M. A. (2018). Arabidopsis heat stress-induced proteins are enriched in electrostatically charged amino acids and intrinsically disordered regions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2276.

Bah, A., & Forman-Kay, J. D. (2016). Modulation of intrinsically disordered protein function by post-translational modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6696-6705.

Bauer, D., Vicziaén, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, 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.

Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, 65(5), 1229-1240.

Bellstaedt, J., Trenner, J., Lippmann, R., Poeschl, Y., Zhang, X., Friml, J., ... & Delker, C. (2019). A mobile auxin signal connects temperature sensing in cotyledons with growth responses in hypocotyls. *Plant Physiology*, 180(2), 757-766.

Bernardo-García, S., de Lucas, M., Martínez, C., Espinosa-Ruiz, A., Daviere, J. M., & Prat, S. (2014). BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. *Genes & development*, 28(15), 1681-1694.

Beyer, H. M., Juillot, S., Herbst, K., Samodelov, S. L., Müller, K., Schamel, W. W., ... & Zurbriggen, M. D. (2015). Red light-regulated reversible nuclear localization of proteins in mammalian cells and zebrafish. *ACS synthetic biology*, 4(9), 951-958.

Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W., & Zurbriggen, M. D. (2015). AQUA cloning: a versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PloS one*, 10(9), e0137652.

Bianchimano, L., De Luca, M. B., Borniego, M. B., Iglesias, M. J., & Casal, J. J. (2023). Temperature regulation of auxin-related gene expression and its implications for plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 74(22), 7015-7033.

- Blomeier, T., Fischbach, P., Koch, L. A., Andres, J., Miñambres, M., Beyer, H. M., & Zurbriggen, M. D. (2021). Blue light-operated CRISPR/Cas13b-mediated mRNA knockdown (lockdown). *Advanced Biology*, 5(5), 2000307.
- Bohn, L., Huang, J., Weidig, S., Yang, Z., Heidersberger, C., Genty, B., ... & Grill, E. (2024). The temperature sensor TWA1 is required for thermotolerance in Arabidopsis. *Nature*, 1-7.
- Box, M. S., Huang, B. E., Domijan, M., Jaeger, K. E., Khattak, A. K., Yoo, S. J., ... & Wigge, P. A. (2015). ELF3 controls thermoresponsive growth in Arabidopsis. *Current biology*, 25(2), 194-199.
- Brunoud, G  rardine, et al. "A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution." *Nature* 482.7383 (2012): 103-106.
- Burgie, E. S., & Vierstra, R. D. (2014). Phytochromes: an atomic perspective on photoactivation and signaling. *The Plant Cell*, 26(12), 4568-4583.
- Burgie, E. S., Gannam, Z. T., McLoughlin, K. E., Sherman, C. D., Holehouse, A. S., Stankey, R. J., & Vierstra, R. D. (2021). Differing biophysical properties underpin the unique signaling potentials within the plant phytochrome photoreceptor families. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(22), e2105649118.
- Burko, Y., Willige, B. C., Seluzicki, A., Nov  k, O., Ljung, K., & Chory, J. (2022). PIF7 is a master regulator of thermomorphogenesis in shade. *Nature Communications*, 13(1), 4942.
- Cardona, A., & Tomancak, P. (2012). Current challenges in open-source bioimage informatics. *Nature methods*, 9(7), 661-665.
- Casal, J. J., & Mazzella, M. A. (1998). Conditional synergism between cryptochrome 1 and phytochrome B is shown by the analysis of phyA, phyB, and hy4 simple, double, and triple mutants in Arabidopsis. *Plant physiology*, 118(1), 19-25.
- Casal, J. J., & Balasubramanian, S. (2019). Thermomorphogenesis. *Annual review of plant biology*, 70(1), 321-346.
- Casal, J. J., & Fankhauser, C. (2023). Shade avoidance in the context of climate change. *Plant Physiology*, 191(3), 1475-1491.
- Casal, J. J., Murcia, G., & Bianchimano, L. (2024). Plant thermosensors. *Annual Review of Genetics*, 58.
- Cascarina, S. M., Elder, M. R., & Ross, E. D. (2020). Atypical structural tendencies among low-complexity domains in the Protein Data Bank proteome. *PLoS computational biology*, 16(1), e1007487.
- Catal  , R., Medina, J., & Salinas, J. (2011). Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(39), 16475-16480.
- Chandler, J. W. (2008). Cotyledon organogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 2917-2931.

- Chantarachot, T., & Bailey-Serres, J. (2018). Polysomes, stress granules, and processing bodies: a dynamic triumvirate controlling cytoplasmic mRNA fate and function. *Plant physiology*, 176(1), 254-269.
- Chen, M., Schwab, R., & Chory, J. (2003). Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14493-14498.
- Chen, D., Lyu, M., Kou, X., Li, J., Yang, Z., Gao, L., ... & Zhong, S. (2022). Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B. *Molecular Cell*, 82(16), 3015-3029.
- Chen, L., Huang, X. X., Zhao, S. M., Xiao, D. W., Xiao, L. T., Tong, J. H., ... & Hou, B. K. (2020). IPyA glucosylation mediates light and temperature signaling to regulate auxin-dependent hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(12), 6910-6917.
- Chung, B. Y., Balcerowicz, M., Di Antonio, M., Jaeger, K. E., Geng, F., Franaszek, K., ... & Wigge, P. A. (2020). An RNA thermoswitch regulates daytime growth in Arabidopsis. *Nature plants*, 6(5), 522-532.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850-861.
- Costa Galvão, V., Fiorucci, A. S., Trevisan, M., Franco-Zorrilla, J. M., Goyal, A., Schmid-Siebert, E., ... & Fankhauser, C. (2019). PIF Transcription Factors Link a Neighbor Threat Cue to Accelerated Reproduction in Arabidopsis.
- Costigliolo Rojas, C., Bianchimano, L., Oh, J., Montepaone, S. R., Tarkowská, D., Minguet, E. G., ... & Casal, J. J. (2022). Organ-specific COP1 control of BES1 stability adjusts plant growth patterns under shade or warmth. *Developmental Cell*, 57(16), 2009-2025.
- Costigliolo Rojas, C., Semmoloni, M., Belmonte, A., Hiltbrunner, A., & Casal, J. J. Drought Reduces COP1-Mediated Shade Avoidance. Available at SSRN 4133890. En revisión.
- Cuevas-Velazquez, C. L., & Dinnyen, J. R. (2018). Organization out of disorder: liquid-liquid phase separation in plants. *Current opinion in plant biology*, 45, 68-74.
- De Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., ... & Olivo-Marin, J. C. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature methods*, 9(7), 690-696.
- De Lucas, M., Daviere, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., ... & Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451(7177), 480-484.
- de Wit, M., Lorrain, S., & Fankhauser, C. (2014). Auxin-mediated plant architectural changes in response to shade and high temperature. *Physiologia plantarum*, 151(1), 13-24.

- Delker, C., Quint, M., & Wigge, P. A. (2022). Recent advances in understanding thermomorphogenesis signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 68, 102231.
- Ding, Lan, et al. "Two B-box domain proteins, BBX18 and BBX23, interact with ELF3 and regulate thermomorphogenesis in Arabidopsis." *Cell Reports* 25.7 (2018): 1718-1728.
- Dünder, G., Ramirez, V. E., & Poppenberger, B. (2024). The heat shock response in plants: new insights into modes of perception, signaling, and the contribution of hormones. *Journal of Experimental Botany*, erae419.
- Emenecker, R. J., Holehouse, A. S., & Strader, L. C. (2020). Emerging roles for phase separation in plants. *Developmental Cell*, 55(1), 69-83.
- Emenecker, R. J., Cammarata, J., Yuan, I., Howard, C., Ebrahimi Naghani, S., Robert, H. S., ... & Strader, L. C. (2023). Absciscic acid biosynthesis is necessary for full auxin effects on hypocotyl elongation. *Development*, 150(23), dev202106.
- Enderle, B., Sheerin, D. J., Paik, I., Kathare, P. K., Schwenk, P., Klose, C., ... & Hiltbrunner, A. (2017). PCH1 and PCHL promote photomorphogenesis in plants by controlling phytochrome B dark reversion. *Nature Communications*, 8(1), 2221.
- Falcone, D. L., Ogas, J. P., & Somerville, C. R. (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition. *BMC plant biology*, 4, 1-15.
- Fendrych, M., Leung, J., & Friml, J. (2016). TIR1/AFB-Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of Arabidopsis hypocotyls. *elife*, 5, e19048.
- Fiorucci, Anne-Sophie, et al. "PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 is important for early responses to elevated temperature in Arabidopsis seedlings." *New phytologist* 226.1 (2020): 50-58.
- Franklin, K. A., Lee, S. H., Patel, D., Kumar, S. V., Spartz, A. K., Gu, C., ... & Gray, W. M. (2011). Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20231-20235.
- Forero, D. A., Lopez-Leon, S., González-Giraldo, Y., & Bagos, P. G. (2019). Ten simple rules for carrying out and writing meta-analyses. *PLoS computational biology*, 15(5), e1006922.
- Fortunato, S., Lasorella, C., Dipierro, N., Vita, F., & de Pinto, M. C. (2023). Redox signaling in plant heat stress response. *Antioxidants*, 12(3), 605.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., ... & Shimada, Y. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant Journal*, 55(3), 526-542.
- Gray, W. M., Östin, 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*, 95(12), 7197-7202.

Gutierrez-Beltran, E., Elander, P. H., Dalman, K., Dayhoff, G. W., Moschou, P. N., Uversky, V. N., ... & Bozhkov, P. V. (2021). Tudor staphylococcal nuclease is a docking platform for stress granule components and is essential for SnRK1 activation in Arabidopsis. *The EMBO journal*, 40(17), e105043.

Hagen, G., & Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant molecular biology*, 49, 373-385.

Hahm, J., Kim, K., Qiu, Y., & Chen, M. (2020). Increasing ambient temperature progressively disassembles Arabidopsis phytochrome B from individual photobodies with distinct thermostabilities. *Nature communications*, 11(1), 1660.

Herud-Sikimić, O., Stiel, A. C., Kolb, M., Shanmugaratnam, S., Berendzen, K. W., Feldhaus, C., ... & Jürgens, G. (2021). A biosensor for the direct visualization of auxin. *Nature*, 592(7856), 768-772.

Hicks, K. A., Millar, A. J., Carre, I. A., Somers, D. E., Straume, M., Meeks-Wagner, D. R., & Kay, S. A. (1996). Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early-flowering 3 mutant. *Science*, 274(5288), 790-792.

Hicks, K. A., Albertson, T. M., & Wagner, D. R. (2001). EARLY FLOWERING₃ encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13(6), 1281-1292.

Hikosaka, K., Ishikawa, K., Borjigidai, A., Muller, O., & Onoda, Y. (2006). Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of experimental botany*, 57(2), 291-302.

Huang, H., McLoughlin, K. E., Sorkin, M. L., Burgie, E. S., Bindbeutel, R. K., Vierstra, R. D., & Nusinow, D. A. (2019). PCH1 regulates light, temperature, and circadian signaling as a structural component of phytochrome B-photobodies in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(17), 8603-8608.

Huang, H., Yoo, C. Y., Bindbeutel, R., Goldsworthy, J., Tielking, A., Alvarez, S., ... & Nusinow, D. A. (2016). PCH1 integrates circadian and light-signaling pathways to control photoperiod-responsive growth in Arabidopsis. *Elife*, 5, e13292.

Huang, H., Alvarez, S., Bindbeutel, R., Shen, Z., Naldrett, M. J., Evans, B. S., ... & Nusinow, D. A. (2016). Identification of evening complex associated proteins in Arabidopsis by affinity purification and mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(1), 201-217.

Huang, Z., Xu, Z., Liu, X., Chen, G., Hu, C., Chen, M., & Liu, Y. (2024). Exploring the Role of the Processing Body in Plant Abiotic Stress Response. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(9), 9844-9855.

Hutin, S., Kumita, J. R., Strotmann, V. I., Dolata, A., Ling, W. L., Louafi, N., ... & Zubieta, C. (2023). Phase separation and molecular ordering of the prion-like domain of the Arabidopsis thermosensory protein EARLY FLOWERING 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(28), e2304714120.

- Huq, E., Al-Sady, B., & Quail, P. H. (2003). Nuclear translocation of the photoreceptor phytochrome B is necessary for its biological function in seedling photomorphogenesis. *The Plant Journal*, 35(5), 660-664.
- Hyman, A. A., Weber, C. A., & Jülicher, F. (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. *Annual review of cell and developmental biology*, 30(1), 39-58.
- Ibañez, C., Delker, C., Martinez, C., Bürstenbinder, K., Janitza, P., Lippmann, R., ... & Quint, M. (2018). Brassinosteroids dominate hormonal regulation of plant thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology*, 28(2), 303-310.
- Jacob, T., Maciel Rodrigues Junior, O., & Quint, M. (2025). Hormonal regulation of root growth under moderately elevated temperatures. *Annals of Botany*, mcafo87.
- Janni, M., Maestri, E., Gulli, M., Marmioli, M., & Marmioli, N. (2024). Plant responses to climate change, how global warming may impact on food security: A critical review. *Frontiers in plant science*, 14, 1297569.
- Jeon, J., & Kim, J. (2013). Cold stress signaling networks in Arabidopsis. *Journal of Plant Biology*, 56, 69-76.
- Jiang, Y., Yang, C., Huang, S., Xie, F., Xu, Y., Liu, C., & Li, L. (2019). The ELF3-PIF7 interaction mediates the circadian gating of the shade response in Arabidopsis. *Iscience*, 22, 288-298.
- Jung, J. H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., ... & Wigge, P. A. (2016). Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science*, 354(6314), 886-889.
- Jung, J. H., Barbosa, A. D., Hutin, S., Kumita, J. R., Gao, M., Derwort, D., ... & Wigge, P. A. (2020). A prion-like domain in ELF3 functions as a thermosensor in Arabidopsis. *Nature*, 585(7824), 256-260.
- Kaganovich, D., Kopito, R., & Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature*, 454(7208), 1088-1095.
- Kearly, A., Nelson, A. D., Skirycz, A., & Chodasiewicz, M. (2024, March). Composition and function of stress granules and P-bodies in plants. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 156, pp. 167-175). Academic Press.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., ... & Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology*, 169(6), 871-884.
- Kedersha, N. A., & Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society Transactions*, 30(6), 963-969.
- Kidokoro, S., Maruyama, K., Nakashima, K., Imura, Y., Narusaka, Y., Shinwari, Z. K., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). The phytochrome-interacting factor PIF7 negatively regulates DREB1 expression under circadian control in Arabidopsis. *Plant physiology*, 151(4), 2046-2057.

- Kim, S., Hwang, G., Kim, S., Thi, T. N., Kim, H., Jeong, J., ... & Oh, E. (2020). The epidermis coordinates thermoresponsive growth through the phyB-PIF4-auxin pathway. *Nature communications*, 11(1), 1053.
- Kim, J., Lee, H., Lee, H. G., & Seo, P. J. (2021). Get closer and make hotspots: liquid–liquid phase separation in plants. *EMBO reports*, 22(5), e51656.
- Kim, C., Kwon, Y., Jeong, J., Kang, M., Lee, G. S., Moon, J. H., ... & Choi, G. (2023). Phytochrome B photobodies are comprised of phytochrome B and its primary and secondary interacting proteins. *Nature Communications*, 14(1), 1708.
- Klose, C., Venezia, F., Hussong, A., Kircher, S., Schäfer, E., & Fleck, C. (2015). Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity. *Nature plants*, 1(7), 1-9.
- Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitelam, 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.
- Kosmacz, M., Gorka, M., Schmidt, S., Luzarowski, M., Moreno, J. C., Szlachetko, J., ... & Skirycz, A. (2019). Protein and metabolite composition of Arabidopsis stress granules. *New Phytologist*, 222(3), 1420-1433.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current opinion in plant biology*, 10(3), 310-316.
- Lau, O. S., & Deng, X. W. (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in plant science*, 17(10), 584-593.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J. M., ... & Quail, P. H. (2008). The Arabidopsis phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *The Plant Cell*, 20(2), 337-352.
- Leivar, P., Martín, G., Soy, J., Dalton-Roesler, J., Quail, P. H., & Monte, E. (2020). Phytochrome-imposed inhibition of PIF7 activity shapes photoperiodic growth in Arabidopsis together with PIF1, 3, 4 and 5. *Physiologia Plantarum*, 169(3), 452-466.
- Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in plant science*, 16(1), 19-28.
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E. S., Rojas, C. C. R., Neme, M., Hiltbrunner, A., ... & Casal, J. J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science*, 354(6314), 897-900.
- Lee, H. J., Jung, J. H., Cortés Llorca, L., Kim, S. G., Lee, S., Baldwin, I. T., & Park, C. M. (2014). FCA mediates thermal adaptation of stem growth by attenuating auxin action in Arabidopsis. *Nature communications*, 5(1), 5473.
- Lee, S., Wang, W., & Huq, E. (2021). Spatial regulation of thermomorphogenesis by HY5 and PIF4 in Arabidopsis. *Nature communications*, 12(1), 3656.

- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R. J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., ... & Chory, J. (2012). Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes & development*, 26(8), 785-790.
- Liao, C. Y., Smet, W., Brunoud, G., Yoshida, S., Vernoux, T., & Weijers, D. (2015). Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nature methods*, 12(3), 207-210.
- Lin, Y., Protter, D. S., Rosen, M. K., & Parker, R. (2015). Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. *Molecular cell*, 60(2), 208-219.
- Lin, W., Zhou, X., Tang, W., Takahashi, K., Pan, X., Dai, J., ... & Yang, Z. (2021). TMK-based cell-surface auxin signalling activates cell-wall acidification. *Nature*, 599(7884), 278-282.
- Lippmann, R., Babben, S., Menger, A., Delker, C., & Quint, M. (2019). Development of wild and cultivated plants under global warming conditions. *Current Biology*, 29(24), R1326-R1338.
- Lokdarshi, A., Conner, W. C., McClintock, C., Li, T., & Roberts, D. M. (2016). Arabidopsis CML38, a calcium sensor that localizes to ribonucleoprotein complexes under hypoxia stress. *Plant physiology*, 170(2), 1046-1059.
- Lorrain, Séverine, et al. "Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors." *The Plant Journal* 53.2 (2008): 312-323.
- Maharjan, P. M., & Choe, S. (2011). High temperature stimulates DWARF4 (DWF4) expression to increase hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Journal of Plant Biology*, 54, 425-429.
- Manna, M., Rengasamy, B., & Sinha, A. K. (2024). A rapid and robust colorimetric method for measuring relative abundance of auxins in plant tissues. *Phytochemical Analysis*.
- Martín, G., Rovira, A., Veciana, N., Soy, J., Toledo-Ortiz, G., Gommers, C. M., ... & Monte, E. (2018). Circadian waves of transcriptional repression shape PIF-regulated photoperiod-responsive growth in Arabidopsis. *Current Biology*, 28(2), 311-318.
- Martínez, C., Espinosa-Ruíz, A., de Lucas, M., Bernardo-García, S., Franco-Zorrilla, J. M., & Prat, S. (2018). PIF 4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *The EMBO journal*, 37(23), e99552.
- Martinière, A., Gibrat, R., Sentenac, H., Dumont, X., Gaillard, I., & Paris, N. (2018). Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6488-6493.
- Mathur, S., Agrawal, D., & Jajoo, A. (2014). Photosynthesis: response to high temperature stress. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 137, 116-126.
- Mazzella, M. A., Alconada Magliano, T. M., & Casal, J. J. (1997). Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant, Cell & Environment*, 20(2), 261-267.

- Medzihradsky, M., Bindics, J., Ádám, É., Viczián, A., Klement, É., Lorrain, S., ... & Nagy, F. (2013). Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(2), 535-544.
- Merret, R., Descombin, J., Juan, Y. T., Favory, J. J., Carpentier, M. C., Chaparro, C., ... & Bousquet-Antonelli, C. (2013). XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell reports*, 5(5), 1279-1293.
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(10), 663-679.
- Mizuno, T., Nomoto, Y., Oka, H., Kitayama, M., Takeuchi, A., Tsubouchi, M., & Yamashino, T. (2014). Ambient temperature signal feeds into the circadian clock transcriptional circuitry through the EC night-time repressor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 55(5), 958-976.
- Monte, Elena, et al. "The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.46 (2004): 16091-16098.
- Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., ... & Taylor, J. P. (2015). Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, 163(1), 123-133.
- Motomura, K., Le, Q. T., Hamada, T., Kutsuna, N., Mano, S., Nishimura, M., & Watanabe, Y. (2015). Diffuse decapping enzyme DCP2 accumulates in DCP1 foci under heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 56(1), 107-115.
- Müller, K., Siegel, D., Jahnke, F. R., Gerrer, K., Wend, S., Decker, E. L., ... & Zurbriggen, M. D. (2014). A red light-controlled synthetic gene expression switch for plant systems. *Molecular BioSystems*, 10(7), 1679-1688.
- Murcia, G., Nieto, C., Sellaro, R., Prat, S., & Casal, J. J. (2022). Hysteresis in PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 and EARLY-FLOWERING 3 dynamics dominates warm daytime memory in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 34(6), 2188-2204.
- Murthy, A. C., Dignon, G. L., Kan, Y., Zerze, G. H., Parekh, S. H., Mittal, J., & Fawzi, N. L. (2019). Molecular interactions underlying liquid–liquid phase separation of the FUS low-complexity domain. *Nature structural & molecular biology*, 26(7), 637-648.
- Nieto, C., Catalán, P., Luengo, L. M., Legris, M., López-Salmerón, V., Davière, J. M., ... & Prat, S. (2021). Day length-dependent thermal COP1 dynamics integrate conflicting seasonal cues in the control of *Arabidopsis* elongation. *bioRxiv*, 2021-11.
- Nieto, C., López-Salmerón, V., Davière, J. M., & Prat, S. (2015). ELF3-PIF4 interaction regulates plant growth independently of the evening complex. *Current Biology*, 25(2), 187-193.

- Nito, K., Wong, C. C., Yates, J. R., & Chory, J. (2013). Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell Reports*, 3(6), 1970-1979.
- Nott, T. J., Petsalaki, E., Farber, P., Jervis, D., Fussner, E., Plochowietz, A., ... & Baldwin, A. J. (2015). Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Molecular cell*, 57(5), 936-947.
- Nozue, K. (2011). Genomic analysis of circadian clock-, light-, and growth-correlated genes reveals PIF5 as a modulator of auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 156, 357-372.
- Nusinow, D. A., Helfer, A., Hamilton, E. E., King, J. J., Imaizumi, T., Schultz, T. F., ... & Kay, S. A. (2011). The ELF4–ELF3–LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature*, 475(7356), 398-402.
- Ochoa-Fernandez, R., Abel, N. B., Wieland, F. G., Schlegel, J., Koch, L. A., Miller, J. B., ... & Zurbriggen, M. D. (2020). Optogenetic control of gene expression in plants in the presence of ambient white light. *Nature methods*, 17(7), 717-725.
- Oh, E., Zhu, J. Y., & Wang, Z. Y. (2012). Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nature cell biology*, 14(8), 802-809.
- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science*, 22(1), 53-65.
- Onuchic, P. L., Milin, A. N., Alshareedah, I., Deniz, A. A., & Banerjee, P. R. (2019). Divalent cations can control a switch-like behavior in heterotypic and homotypic RNA coacervates. *Scientific reports*, 9(1), 12161.
- Orbović, V., & Poff, K. L. (2007). Effect of temperature on growth and phototropism of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of plant growth regulation*, 26, 222-228.
- Pacín, M., Semmoloni, M., Legris, M., Finlayson, S. A., & Casal, J. J. (2016). Convergence of CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR signalling during shade avoidance. *New Phytologist*, 211(3), 967-979.
- Parent, B., & Tardieu, F. (2012). Temperature responses of developmental processes have not been affected by breeding in different ecological areas for 17 crop species. *New Phytologist*, 194(3), 760-774.
- Pham, V. N., Kathare, P. K., & Huq, E. (2018). Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant physiology*, 176(2), 1025-1038.
- Park, E., Kim, Y., & Choi, G. (2018). Phytochrome B requires PIF degradation and sequestration to induce light responses across a wide range of light conditions. *The Plant Cell*, 30(6), 1277-1292.
- Park, Y. J., Lee, H. J., Ha, J. H., Kim, J. Y., & Park, C. M. (2017). COP 1 conveys warm temperature information to hypocotyl thermomorphogenesis. *New Phytologist*, 215(1), 269-280.

- Park, E., Kim, J., Lee, Y., Shin, J., Oh, E., Chung, W. I., ... & Choi, G. (2004). Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant and Cell Physiology*, 45(8), 968-975.
- Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M. Y., ... & Alberti, S. (2015). A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell*, 162(5), 1066-1077.
- Pereyra, M. E., Costigliolo Rojas, C., Jarrell, A. F., Hovland, A. S., Snipes, S. A., Nagpal, P., ... & Casal, J. J. (2023). PIF4 enhances the expression of SAUR genes to promote growth in response to nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(39), e2304513120.
- Prigge, M. J., Kadakia, N., Greenham, K., & Estelle, M. (2019). Members of the Arabidopsis auxin receptor gene family are essential early in embryogenesis and have broadly overlapping functions. *bioRxiv*.
- Procko, C., Crenshaw, C. M., Ljung, K., Noel, J. P., & Chory, J. (2014). Cotyledon-generated auxin is required for shade-induced hypocotyl growth in *Brassica rapa*. *Plant physiology*, 165(3), 1285-1301.
- Protter, D. S., & Parker, R. (2016). Principles and properties of stress granules. *Trends in cell biology*, 26(9), 668-679.
- Pucciariello, Ornella, et al. "Rewiring of auxin signaling under persistent shade." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.21 (2018): 5612-5617.
- Quint, M., Delker, C., Balasubramanian, S., Balcerowicz, M., Casal, J. J., Castroverde, C. D. M., ... & van Zanten, M. (2023). 25 Years of thermomorphogenesis research: milestones and perspectives. *Trends in Plant Science*.
- Quint, M., Delker, C., Franklin, K. A., Wigge, P. A., Halliday, K. J., & Van Zanten, M. (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature plants*, 2(1), 1-9.
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rausenberger, J., Hussong, A., Kircher, S., Kirchenbauer, D., Timmer, J., Nagy, F., ... & Fleck, C. (2010). An integrative model for phytochrome B mediated photomorphogenesis: from protein dynamics to physiology. *PLoS One*, 5(5), e10721.
- Reed, Jason W., et al. "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* 5.2 (1993): 147-157.
- Ren, S., Ma, K., Lu, Z., Chen, G., Cui, J., Tong, P., ... & Jin, B. (2019). Transcriptomic and metabolomic analysis of the heat-stress response of *Populus tomentosa* Carr. *Forests*, 10(5), 383.
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, 40(2), 253-266.

- Roden, C., & Gladfelter, A. S. (2021). RNA contributions to the form and function of biomolecular condensates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(3), 183-195.
- Romero-Montepaone, Sofia, et al. "Functional convergence of growth responses to shade and warmth in Arabidopsis." *New Phytologist* 231.5 (2021): 1890-1905.
- Ronald, J., Wilkinson, A. J., & Davis, S. J. (2021). EARLY FLOWERING3 sub-nuclear localization responds to changes in ambient temperature. *Plant Physiology*, 187(4), 2352-2355.
- Salehin, M., Li, B., Tang, M., Katz, E., Song, L., Ecker, J. R., ... & Estelle, M. (2019). Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in Arabidopsis by regulating glucosinolate levels. *Nature communications*, 10(1), 4021.
- 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.
- Shen, Y., Khanna, R., Carle, C. M., & Quail, P. H. (2007). Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation. *Plant physiology*, 145(3), 1043-1051.
- Shin, Jieun, Eunae Park, and Giltso Choi. "PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in Arabidopsis." *The Plant Journal* 49.6 (2007): 981-994.
- Silva, C. S., Nayak, A., Lai, X., Hutin, S., Hugouvieux, V., Jung, J. H., ... & Zubieta, C. (2020). Molecular mechanisms of Evening Complex activity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(12), 6901-6909.
- Sorenson, R., & Bailey-Serres, J. (2014). Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2373-2378.
- Spartz, A. K., Ren, H., Park, M. Y., Grandt, K. N., Lee, S. H., Murphy, A. S., ... & Gray, W. M. (2014). SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(5), 2129-2142.
- Stavang, J. A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M. D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J. E., ... & Blázquez, M. A. (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 60(4), 589-601.
- Strom, A. R., Emelyanov, A. V., Mir, M., Fyodorov, D. V., Darzacq, X., & Karpen, G. H. (2017). Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, 547(7662), 241-245.
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., & Li, C. (2012). PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating Arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS genetics*, 8(3), e1002594.

- Takahashi, M., Higuchi, M., Matsuki, H., Yoshita, M., Ohsawa, T., Oie, M., & Fujii, M. (2013). Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Molecular and cellular biology*, 33(4), 815-829.
- Tao, Y., Ferrer, J. L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., ... & Chory, J. (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133(1), 164-176.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell*, 15(8), 1749-1770.
- Toledo-Ortiz, G., Johansson, H., Lee, K. P., Bou-Torrent, J., Stewart, K., Steel, G., ... & Halliday, K. J. (2014). The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription. *PLoS genetics*, 10(6), e1004416.
- Tong, Jinjin, et al. "ALBA proteins confer thermotolerance through stabilizing HSF messenger RNAs in cytoplasmic granules." *Nature Plants* 8.7 (2022): 778-791.
- Ulmasov, T., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 276(5320), 1865-1868.
- Van Buskirk, E. K., Reddy, A. K., Nagatani, A., & Chen, M. (2014). Photobody localization of phytochrome B is tightly correlated with prolonged and light-dependent inhibition of hypocotyl elongation in the dark. *Plant physiology*, 165(2), 595-607.
- Van Treeck, B., & Parker, R. (2018). Emerging roles for intermolecular RNA-RNA interactions in RNP assemblies. *Cell*, 174(4), 791-802.
- Viczián, A., Ádám, É., Staudt, A. M., Lambert, D., Klement, E., Romero Montepaone, S., ... & Klose, C. (2020). Differential phosphorylation of the N-terminal extension regulates phytochrome B signaling. *New Phytologist*, 225(4), 1635-1650.
- Wang, Wenfei, Ming-Yi Bai, and Zhi-Yong Wang. "The brassinosteroid signaling network—a paradigm of signal integration." *Current opinion in plant biology* 21 (2014): 147-153.
- Wang, J., Jin, D., Deng, Z., Zheng, L., Guo, P., Ji, Y., ... & Wei, N. (2025). The apoplastic pH is a key determinant in the hypocotyl growth response to auxin dosage and light. *Nature Plants*, 1-16.
- Wang, X., Yu, R., Wang, J., Lin, Z., Han, X., Deng, Z., ... & Chen, H. (2020). The asymmetric expression of SAUR genes mediated by ARF7/19 promotes the gravitropism and phototropism of plant hypocotyls. *Cell reports*, 31(3).
- Wanner, L. A., & Junttila, O. (1999). Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant physiology*, 120(2), 391-400.
- Weijers, D., & Wagner, D. (2016). Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annual review of plant biology*, 67(1), 539-574.

- Wu, J., Wang, W., Xu, P., Pan, J., Zhang, T., Li, Y., ... & Lian, H. (2019). phyB interacts with BES1 to regulate brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 60(2), 353-366.
- Xi, Y., Yang, Y., Yang, J., Zhang, X., Pan, Y., & Guo, H. (2021). IAA3-mediated repression of PIF proteins coordinates light and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 17(2), e1009384.
- Xie, Y., Liu, W., Liang, W., Ling, X., Ma, J., Yang, C., & Li, L. (2023). Phytochrome B inhibits the activity of phytochrome-interacting factor 7 involving phase separation. *Cell Reports*, 42(12).
- Xue, M., Zhang, H., Zhao, F., Zhao, T., Li, H., & Jiang, D. (2021). The INO80 chromatin remodeling complex promotes thermomorphogenesis by connecting H2A. Z eviction and active transcription in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 14(11), 1799-1813.
- Xu, Y., & Zhu, Z. (2020). Absciscic acid suppresses thermomorphogenesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior*, 15(5), 1746510.
- Yamaguchi, Rumi, et al. "Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis." *The Journal of cell biology* 145.3 (1999): 437-445.
- Yin, Yanhai, et al. "BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation." *Cell* 109.2 (2002): 181-191.
- Yu, Z., Ma, J., Zhang, M., Li, X., Sun, Y., Zhang, M., & Ding, Z. (2023). Auxin promotes hypocotyl elongation by enhancing BZR1 nuclear accumulation in Arabidopsis. *Science advances*, 9(1), eade2493.
- Zagotta, Michelle T., et al. "The Arabidopsis ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering." *The Plant Journal* 10.4 (1996): 691-702.
- Zhang, Junrui, Robert J. Stankey, and Richard D. Vierstra. "Structure-guided engineering of plant phytochrome B with altered photochemistry and light signaling." *Plant Physiology* 161.3 (2013): 1445-1457.
- Zhang, B., Holmlund, M., Lorrain, S., Norberg, M., Bako, L., Fankhauser, C., & Nilsson, O. (2017). BLADE-ON-PETIOLE proteins act in an E3 ubiquitin ligase complex to regulate PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 abundance. *Elife*, 6, e26759.
- Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., & Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 117.
- Zhu, S., Gu, J., Yao, J., Li, Y., Zhang, Z., Xia, W., ... & Liu, C. (2022). Liquid-liquid phase separation of RBGD2/4 is required for heat stress resistance in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 57(5), 583-597.
- Zhu, J. Y., Oh, E., Wang, T., & Wang, Z. Y. (2016). TOC1-PIF4 interaction mediates the circadian gating of thermoresponsive growth in Arabidopsis. *Nature Communications*, 7(1), 13692.

Anexo

Anexo

Tabla 1. Lista de los estudios incluidos en el meta-análisis.

Referencia	GEO <i>accession</i>	Día (h)/ Noche (h)	Muestras	Duración del tratamiento de temperatura (h)
Cortijo S, Charoensawan V, Brestovitsky A, Buning R, Ravarani C, Rhodes D, van Noort J, Jaeger KE, Wigge PA. Transcriptional Regulation of the Ambient Temperature Response by H2A.Z Nucleosomes and HSF1 Transcription Factors in Arabidopsis. Mol Plant. 2017 Oct 9;10(10):1258-1273. doi: 10.1016/j.molp.2017.08.014. Epub 2017 Sep 8. PMID: 28893714; PMCID: PMC6175055.	GSE79355	8 / 16	Plántulas de 10 días	1 y 4
Grinevich DO, Desai JS, Stroup KP, Duan J, Slabaugh E, Doherty CJ. Novel transcriptional responses to heat revealed by turning up the heat at night. Plant Mol Biol. 2019 Sep;101(1-2):1-19. doi: 10.1007/s11103-019-00873-3. Epub 2019 May 6. PMID: 31062216; PMCID: PMC6695350.	SRP159259	12 / 12	Plántulas de 14 días	1.5
Zhang SS, Yang H, Ding L, Song ZT, Ma H, Chang F, Liu JX. Tissue-Specific Transcriptomics Reveals an Important Role of the Unfolded Protein Response in Maintaining Fertility upon Heat Stress in Arabidopsis. Plant Cell. 2017 May;29(5):1007-1023. doi: 10.1105/tpc.16.00916. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28442596; PMCID: PMC5466030.	GSE94015	16 / 8	Rosetas de plantas con flor	3
Schlaen RG, Mancini E, Sanchez SE, Perez-Santángelo S, Rugnone ML, Simpson CG, Brown JW, Zhang X, Chernomoretz A, Yanovsky MJ. The spliceosome assembly factor GEMIN2 attenuates the effects of temperature on alternative splicing and circadian rhythms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jul 28;112(30):9382-7. doi: 10.1073/pnas.1504541112. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26170331; PMCID: PMC4522771.	GSE63406	24 / 0	Plántulas de 9 días	1 y 24

Yang R, Hong Y, Ren Z, Tang K, Zhang H, Zhu JK, Zhao C. A Role for PICKLE in the Regulation of Cold and Salt Stress Tolerance in Arabidopsis. <i>Front Plant Sci.</i> 2019 Jul 9;10:900. doi: 10.3389/fpls.2019.00900. PMID: 31354770; PMCID: PMC6633207.	GSE127819	16 / 8	Plántulas de 10 días	3 y 24
Blair EJ, Bonnot T, Hummel M, Hay E, Marzolino JM, Quijada IA, Nagel DH. Contribution of time of day and the circadian clock to the heat stress responsive transcriptome in Arabidopsis. <i>Sci Rep.</i> 2019 Mar 18;9(1):4814. doi: 10.1038/s41598-019-41234-w. PMID:30886204; PMCID: PMC6423321.	GSE116004	12/12	Plántulas de 12 días	1
Wang L, Ma KB, Lu ZG, Ren SX, Jiang HR, Cui JW, Chen G, Teng NJ, Lam HM, Jin B. Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of Arabidopsis leaves under prolonged warming and heat shock. <i>BMC Plant Biol.</i> 2020 Feb 22;20(1):86. doi: 10.1186/s12870-020-2292-y. PMID: 32087683; PMCID: PMC7036190.	GSE118298	16/8	Hojas de plantas de 30 días	6
Jia Y, Ding Y, Shi Y, Zhang X, Gong Z, Yang S. The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in Arabidopsis. <i>New Phytol.</i> 2016 Oct;212(2):345-53. doi: 10.1111/nph.14088. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27353960.	GSE130729	16/8	Plántulas de 14 días	3 y 24
Yu H, Kong X, Huang H, Wu W, Park J, Yun DJ, Lee BH, Shi H, Zhu JK. STCH4/REIL2 Confers Cold Stress Tolerance in Arabidopsis by Promoting rRNA Processing and CBF Protein Translation. <i>Cell Rep.</i> 2020 Jan 7;30(1):229-242.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.12.012. PMID: 31914389.	GSE141304	16/8	Plántulas de 14 días	4 y 24
Ding L, Wang S, Song ZT, Jiang Y, Han JJ, Lu SJ, Li L, Liu JX. Two B-Box Domain Proteins, BBX18 and BBX23, Interact with ELF3 and Regulate Thermomorphogenesis in Arabidopsis. <i>Cell Rep.</i> 2018 Nov 13;25(7):1718-1728.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.060. PMID: 30428343.	GSE108162	16/8	Plántulas de 7 días	24

Lee S, Zhu L, Huq E. An autoregulatory negative feedback loop controls thermomorphogenesis in Arabidopsis. PLoS Genet. 2021 Jun 1;17(6):e1009595. doi: 10.1371/journal.pgen.1009595. PMID: 34061850; PMCID: PMC8195427.	GSE158992	24/0	Plántulas de 5 días	24
Lee A, Park HJ, Jo SH, Jung H, Kim HS, Lee HJ, Kim YS, Jung C, Cho HS. The spliceophilin CYP18-2 is mainly involved in the splicing of retained introns under heat stress in Arabidopsis. J Integr Plant Biol. 2023 Jan 13. doi: 10.1111/jipb.13450. Epub ahead of print. PMID: 36636802.	GSE166755	16/8	Hojas de roseta de plantas de 3 semanas	1
Lee S, Paik I, Huq E. SPAs promote thermomorphogenesis by regulating the phyB-PIF4 module in Arabidopsis. Development. 2020 Oct 8;147(19):dev189233. doi: 10.1242/dev.189233. PMID: 32994167; PMCID: PMC7561471.	GSE142354	16/8	Plántulas de 6 días	24
Xue M, Zhang H, Zhao F, Zhao T, Li H, Jiang D. The INO80 chromatin remodeling complex promotes thermomorphogenesis by connecting H2A.Z eviction and active transcription in Arabidopsis. Mol Plant. 2021 Nov 1;14(11):1799-1813. doi: 10.1016/j.molp.2021.07.001. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34242850.	GSE168118	8/16	Plántulas de 7 días	12
Lee S, Wang W, Huq E. Spatial regulation of thermomorphogenesis by HY5 and PIF4 in Arabidopsis. Nat Commun. 2021 Jun 16;12(1):3656. doi: 10.1038/s41467-021-24018-7. PMID: 34135347; PMCID: PMC8209091.	GSE158939	16/8	Plántulas de 5 días	24
Romero-Montepaone S, Sellaro R, Esteban Hernando C, Costigliolo-Rojas C, Bianchimano L, Ploschuk EL, Yanovsky MJ, Casal JJ. Functional convergence of growth responses to shade and warmth in Arabidopsis. New Phytol. 2021 Sep;231(5):1890-1905. doi: 10.1111/nph.17430. Epub 2021 Jun 26. PMID: 33909310.	GSE162240	10 / 14	Plántulas de 4 días	10
Suzuki N, Bassil E, Hamilton JS, Inupakutika MA, Zandalinas SI, Tripathy D, Luo Y, Dion E, Fukui G, Kumazaki A, Nakano R, Rivero RM, Verbeck GF, Azad RK, Blumwald E, Mittler R. ABA Is Required for Plant Acclimation to a Combination of Salt and Heat Stress. PLoS One. 2016 Jan 29;11(1):e0147625.	GSE72806	12/12	Hojas de plantas de 12 días	1

doi:10.1371/journal.pone.0147625.
PMID: 26824246; PMCID: PMC4733103.

Pietzenuk B, Markus C, Gaubert H, Bagwan N, Merotto A, Bucher E, Pecinka A. Recurrent evolution of heat-responsiveness in Brassicaceae COPIA elements. *Genome Biol.* 2016 Oct 11;17(1):209.
doi: 10.1186/s13059-016-1072-3.
PMID: 27729060; PMCID: PMC5059998.

Esteve-Bruna D, Carrasco-López C, Blanco-Touriñán N, Iserte J, Calleja-Cabrera J, Perea-Resa C, Úrbez C, Carrasco P, Yanovsky MJ, Blázquez MA, Salinas J, Alabadí D. Prefoldins contribute to maintaining the levels of the spliceosome LSM2-8 complex through Hsp90 in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 2020 Jun 19;48(11):6280-6293.
doi: 10.1093/nar/gkaa354. PMID: 32396196; PMCID: PMC7293050.

Tabla 2. Análisis de regresión lineal múltiple *stepwise* de la Figura 4.1, realizado en R.

En el análisis con los datos de la figura 4.1.A se tomó como referencia el crecimiento de Col-o a 28 °C en luz roja. Las variables usadas fueron Genotipo (Col-o, *pchl1*, *pchl*, *pchl1 pchl*), Luz (luz roja, pulsos de luz roja, luz roja lejana) y Temperatura (28 °C y 37 °C). El modelo con menor AIC fue: Crecimiento ~ Luz + Temperatura + Luz*Temperatura. Los resultados fueron:

Coefficientes:

	Estimación	Error Std.	t	Pr(> t)
(Constante)	0.014876	0.001219	12.199	< 2e-16 ***
RL	0.010131	0.001725	5.874	2.34e-08 ***
Pulsos Rojo	-0.005472	0.001725	-3.173	0.00181 **
37grados	-0.002562	0.001725	-1.486	0.13933
RL*37grados	-0.010950	0.002439	-4.490	1.35e-05 ***
Pulsos Rojo*37grados	0.004484	0.002439	1.839	0.06779 .

Signif. codigos: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En el análisis con los datos de la figura 4.1.B se tomó como referencia el crecimiento de *35S:PHYB-YFP* a 28 °C en luz roja. Las variables usadas fueron Genotipo (*35S:PHYB-YFP*, 856A (35S) y 856D (35S)), Luz (luz roja, pulsos de luz roja, luz roja lejana) y Temperatura (28 °C y 37 °C). El modelo con menor AIC fue: Crecimiento ~ Luz + Temperatura + Genotipo + Luz*Temperatura + Temperatura*Genotipo + Luz*Genotipo + Temperatura*Luz*Genotipo. Los resultados fueron:

Coeficientes:

	Estimación	Error Std.	t	Pr(> t)	
(Constante)	0.014226	0.001997	7.123	2.6e-09	***
37grados	-0.004273	0.002825	-1.513	0.13618	
RL	0.009767	0.002825	3.458	0.00107	**
Pulsos Rojo	-0.006461	0.002825	-2.287	0.02613	*
586A	-0.008775	0.002825	-3.107	0.00302	**
586D	0.009142	0.002825	3.237	0.00207	**
37grados*RL	-0.011678	0.003995	-2.923	0.00505	**
37grados*Pulsos Rojo	0.003308	0.003995	0.828	0.41123	
37grados*856A	0.006336	0.003995	1.586	0.11853	
37gradosD	-0.011684	0.003995	-2.925	0.00503	**
RL*856A	-0.003895	0.003995	-0.975	0.33385	
Pulsos Rojo*856A	0.006246	0.003995	1.564	0.12377	
RL*856D	-0.001825	0.003995	-0.457	0.64961	
Pulsos Rojo*856D	-0.009255	0.003995	-2.317	0.02433	*
37grados*RL*856A	0.005555	0.005649	0.983	0.32985	
37grados*Pulsos Rojo*856A	-0.003109	0.005649	-0.550	0.58438	
37grados*RL*856D	0.002505	0.005649	0.443	0.65921	
37grados*Pulsos Rojo*856D	0.012120	0.005649	2.145	0.03643	*

Por último, para el análisis con los datos de *phyb* de la figura 4.1.A se tomó como referencia el crecimiento en luz roja a 28 °C. Las variables usadas fueron Luz (luz roja, pulsos de luz roja, luz roja lejana) y Temperatura (28 °C y 37 °C). El modelo con menor AIC fue: Crecimiento ~ Temperatura. Los resultados fueron:

Coeficientes:

	Estimación	Error Std.	t	Pr(> t)	
(Constante)	0.045967	0.002419	19.003	3.87e-15	***
37grados	-0.027740	0.003421	-8.109	4.71e-08	***

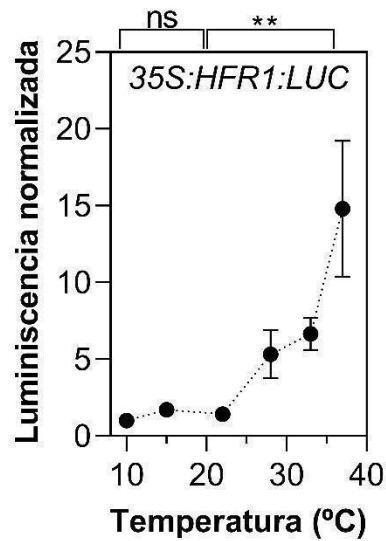


Figura anexo 2: control positivo de luminómetro de 4 horas de tratamiento. Plantas medidas a las 4 horas de tratamiento de 10 °C, 15 °C, 22 °C, 28 °C, 33 °C y 37 °C. Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 3 réplicas biológicas. Análisis estadístico entre 10 °C y 22 °C corresponde a ANOVA con comparaciones múltiples mediante la prueba de Dunnet y entre 22 °C y 37 °C a regresión lineal.

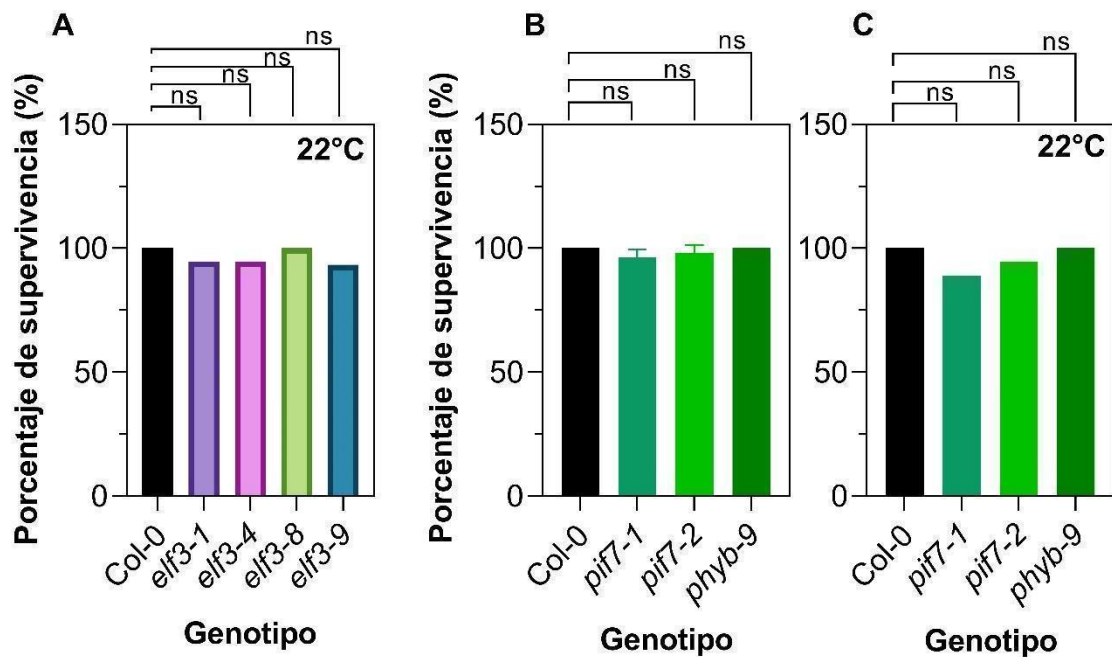


Figura anexo 3: ELF3 ayuda a la supervivencia en temperaturas muy altas pero no en temperaturas templadas mientras que phyB y PIF7 no son fundamentales para la

supervivencia por estrés térmico. Porcentaje de plantas supervivientes de Col-o y de distintos alelos mutantes pérdida de función de *elf3* mantenidas a 22 °C durante el mismo tiempo que el tratamiento de estrés, como control (**A**), y de mutantes *pif7* y *phyB* luego de ser sometidas a 37 °C durante 8 horas y luego recuperadas a 22 °C por 24 horas (**B**), junto con su control mantenido a 22 °C (**C**). Los valores graficados corresponden al promedio $\pm$ EE de 3 réplicas biológicas. Análisis estadístico corresponde a ANOVA con comparaciones múltiples señaladas entre corchetes, mediante la prueba de Dunnet.