



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Plant Molecular and Cellular Biology Joint Research Institute (IBMCP)

Molecular and phenotypic analysis of shade-tolerant tomato
lines.

Master's Thesis

Master's Degree in Plant Molecular and Cellular Biotechnology

AUTHOR: Berdonces Bóveda, Andrea

Tutor: Porcel Roldán, Rosa Caridad

Experimental director: Rodriguez Concepcion, Manuel

ACADEMIC YEAR: 2024/2025

SUMMARY

Dramatic changes will need to be undertaken in the coming years for our agriculture to face climate change challenges while improving sustainability. In the context of the PRIMA project UToPIQ (<https://utopiq.webs.upv.es/>), the host lab is generating tomato (*Solanum lycopersicum*) lines with a reduced response to light signals simulating the presence of neighboring plants (referred to as proximity shade). These shade-tolerant lines are expected to perform better under high-density or intercropping configurations, farming practices that involve plants growing in close proximity to one another. The experimental activities will focus on identifying tomato lines defective in transcription factors of the phytochrome-interacting factors (PIF) family, which are promoters of the response to shade and evaluating how the identified mutants respond to simulated shade in the lab at molecular and phenotypic levels, including elongation growth and photosynthetic performance. At the end of the project, we expect to show whether shade-tolerant lines identified in the lab may represent an improvement for farming agrosystems involving closely interacting plants.

Key words: tomato; proximity shade; phytochrome-interacting factors (PIF)

RESUMEN

En los próximos años, será necesario implementar cambios significativos en la agricultura para enfrentar los desafíos del cambio climático mientras se mejora la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. En el contexto del proyecto PRIMA UToPIQ (<https://utopiq.webs.upv.es/>), el laboratorio está generando líneas de tomate (*Solanum lycopersicum*) con una respuesta reducida a las señales de luz que simulan la presencia de plantas vecinas, conocida como sombra de proximidad o *proximity shade*. Se espera que estas líneas tolerantes a la sombra presenten un mejor rendimiento en sistemas de cultivo de alta densidad o en cultivos intercalados, prácticas agrícolas en las que las plantas crecen próximas unas a otras. Las actividades experimentales se centrarán en la identificación de líneas de tomate defectuosas en factores de transcripción de la familia de *phytochrome-interacting factors* (PIF), los cuales son promotores de la respuesta a la sombra y evaluar cómo responden los mutantes identificados a la sombra simulada en el laboratorio, tanto a nivel molecular como fenotípico, incluyendo el crecimiento por elongación y el rendimiento fotosintético. Al finalizar el proyecto, se espera demostrar si las líneas de tomate tolerantes a la sombra identificadas en el laboratorio representan una mejora significativa para los sistemas agrícolas donde las plantas crecen en interacción cercana.

Palabras clave: tomate; sombra de proximidad; phytochrome-interacting factors (PIF)

**ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030****Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030**

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.			X	
ODS 2. Hambre cero.	X			
ODS 3. Salud y bienestar.			X	
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.		X		
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.		X		
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.	X			
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.		X		
ODS 12. Producción y consumo responsables.	X			
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.		X		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.		X		

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

El TFM se alinea de manera significativa con los ODS 2, 9, 12 y 13. Al contribuir a la mejora de prácticas agrícolas sostenibles y resistentes frente al cambio climático, el TFM promueve el aumento de la productividad y la seguridad alimentaria, además de fomentar la innovación en sistemas agrícolas. Asimismo, el enfoque experimental y biotecnológico del proyecto impulsa la investigación en infraestructuras sostenibles, alineándose con los principios de innovación responsable y sostenibilidad climática.

AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Fin de Máster ha sido una experiencia llena de aprendizajes y descubrimientos. No solo me ha permitido tener una visión más amplia acerca del trabajo en el laboratorio y conocer de cerca cómo se construye la ciencia día a día, sino también entender todo el esfuerzo y perseverancia que hay detrás de cada experimento. Pero más allá del aprendizaje académico y científico, lo que realmente ha hecho que esta experiencia haya sido tan enriquecedora ha sido la gente que me ha acompañado en el camino. Este proyecto no habría sido posible sin la ayuda, el apoyo y, sobre todo, la paciencia de quienes han estado a mi lado durante estos meses.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor Manuel, por darme la oportunidad de formar parte del proyecto y por su dedicación en todo momento. Su confianza, experiencia y disponibilidad para ayudarme en cada etapa de este proceso han sido esenciales para que este trabajo se lleve a cabo.

Del mismo modo, dar las gracias a todos mis compañeros de laboratorio, tanto del 0.06 como del 0.05, por crear siempre tan buen ambiente, ayudarme en todo lo posible y haberme echo sentir una más desde el primer momento. En especial, me gustaría darle las gracias a Laura, por su ayuda infinita, por todo lo que me ha enseñado y por las mil y una charlas que hemos tenido estos meses. Sin ella esta experiencia hubiese sido totalmente distinta. También, agradecer a Esteban y a Pablo, por ser un apoyo fundamental día y día y por hacer que me lleve tan buen recuerdo de esta etapa.

Por otro lado, no me podía olvidar de todos mis compañeros del máster. Ellos han sido los que me han hecho sentir en casa y con los que me llevo recuerdos para toda la vida. Han estado siempre ahí y hemos compartido muchísimos momentos en este año y medio, desde comidas, fiestas, viajes y todo tipo planes hasta mil horas en clase y momentos en los que nos replanteábamos todo. Es por ello, que sin ellos esta experiencia hubiese sido mucho más complicada. Cada uno de ellos me ha aportado algo, pero quería darle las gracias especialmente a Marion, por ser mi día a día y uno de mis mayores apoyos a lo largo de estos meses, a Xulia, por estar siempre, por confiar en mí y convertirse en uno de mis lugares seguros y a Ave, Abraham, Loren, Jose y Victor por ser un apoyo incondicional en todo momento y personas a las que he podido acudir siempre.

No me puedo olvidar de mi padres y abuelos, que siempre han estado al otro lado del teléfono cuando les he necesitado. Gracias por vuestro amor incondicional y por ser los primeros en confiar en mí. Por último, agradecer a mis amigos, que al igual que mi familia han estado presentes en todo momento y en especial a Nerea por ser casa, por todo el apoyo moral y una de las personas mas importantes de mi paso por Valencia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	1
1. Adaptación de las plantas a la variabilidad del espectro lumínico y su respuesta a la competencia por la luz	1
2. Efecto de la sombra en las plantas.....	3
2.1 Plantas que evitan la sombra.....	3
2.2 Plantas tolerantes a sombra.....	4
3. Regulación molecular de la evitación a la sombra	4
3.1 Percepción del cambio en R:FR: Fitocromos	4
3.2 Transducción de la señal: PIFS.....	6
4. Creando plantas tolerantes a sombra	8
OBJETIVOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Material vegetal y condiciones de crecimiento	11
Extracciones de DNA.....	13
Genotipado y secuenciación.....	13
Fenotipado.....	14
Medición del contenido de clorofilas	14
Medición del rendimiento fotosintético	14
Extracción y análisis de metabolitos	14
Microscopia.....	15
Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS.....	16
1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA SOMBRA EN LA VARIEDAD M82	16
a) Respuestas de crecimiento	16
b) Contenido de clorofilas y carotenoides.....	18
c) Rendimiento fotosintético	19
2. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE PIF1 EN EL FONDO GENÉTICO MICRO-TOM.....	19
2.1 Confirmación de la pérdida de función de PIF1a en el alelo <i>pif1a.2</i>	20
2.2 Caracterización de la respuesta a sombra de proximidad	21
3. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE PIF7 EN EL FONDO GENÉTICO MICRO-TOM.....	23
3.1 Generación de líneas de pérdida de función de PIF7.....	23
3.2 Caracterización de la respuesta a sombra de proximidad	25
4. EXPERIMENTO DE LINEAS MUTANTES PIF EN FONDO GENÉTICO M82.....	28
a) Respuesta de crecimiento.....	29

b) Contenido de clorofilas y carotenoides.....	32
c) Rendimiento fotosintético	32
DISCUSIÓN.....	33
1. Diferencias entre el crecimiento en condiciones de alta densidad (HD) y el crecimiento en condiciones de sombra simulada (W+FR).....	33
2. Efecto de los genes PIF de tomate en la respuesta a sombra simulada (W+FR).....	35
2.1 Efecto de los genes codificantes para PIF1	35
2.2 Efecto de los genes codificantes para PIF7 y otros PIF	36
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
MATERIAL SUPLEMENTARIO	46

ABREVIATURAS

UV: Radiación ultravioleta	PAR: <i>Photosynthetic active radiation</i>
R: Luz roja	FR: Luz roja lejana
R:FR: Proporción luz roja/luz roja lejana	SAS: <i>Shade avoidance syndrome</i>
phy A: Fitocromo A	phy B: Fitocromo B
W: Luz blanca	W+FR: Luz blanca combinada con luz roja lejana
LD: Baja densidad (<i>low density</i>)	HD: Alta densidad (<i>high density</i>)
HDg: Plantas grandes en alta densidad	HDp: Plantas pequeña en alta densidad

INTRODUCCIÓN

La luz es una forma de radiación electromagnética que se propaga en forma de ondas, cada una con longitudes específicas que determinan sus características y efectos sobre los organismos vivos (Ryer, 1998). En las plantas, la luz solar desempeña un papel esencial no solo como fuente de energía, sino también como señal reguladora de numerosos procesos biológicos (Rajapakse et al., 1999; Kendrick and Kronenberg, 1994).

Las plantas, como organismos fotosintéticos, tienen la capacidad de transformar la energía solar en energía química y de fijar el CO₂ atmosférico, produciendo compuestos orgánicos esenciales para su crecimiento y desarrollo. Además de su papel en la fotosíntesis, la luz regula múltiples respuestas fisiológicas a lo largo del ciclo de vida de las plantas, mediante un conjunto de procesos conocidos como fotomorfogénesis (Kendrick and Kronenberg, 1994). Estas respuestas incluyen procesos reversibles, como la apertura de estomas y el fototropismo, o irreversibles, como la germinación de semillas, el crecimiento de la planta y la inducción floral (Quail, 1991; Chory, 1993; Deng, 1994; Dong et al., 2015; Fernando and Schreoder, 2016).

La disponibilidad de luz en los ecosistemas naturales y agrícolas puede variar considerablemente debido a factores como la latitud, la sombra generada por otras plantas o la densidad de la vegetación (Martinez-García et al., 2010). Estas condiciones cambiantes obligan a las plantas a ajustar su fisiología y morfología para evitar que su crecimiento y rendimiento fotosintético se vea afectado.

1. Adaptación de las plantas a la variabilidad del espectro lumínico y su respuesta a la competencia por la luz

La luz solar que incide sobre la superficie terrestre se compone principalmente de radiación ultravioleta (UV), luz visible y radiación infrarroja.

La luz visible abarca un rango de longitud de onda que oscila entre los 380 y 750 nm, e incluye los colores perceptibles por el ojo humano, desde el azul hasta el rojo lejano (Figura 1). Dentro de este espectro, el rango comprendido entre 400 y 700 nm (Smith, 1982), denominado como Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR, por sus siglas en inglés), resulta fundamental para el metabolismo de las plantas. Este segmento del espectro es utilizado por los pigmentos fotosintéticos, como la clorofila y los carotenoides, para convertir la energía luminosa en energía química durante la fotosíntesis (Morales et al., 2002). Es por ello, que la eficiencia de la fotosíntesis y la síntesis de compuestos orgánicos a partir de CO₂ y agua, dependerá directamente de la intensidad de PAR disponible (Olle et al., 2019).

Además, la radiación fotosintéticamente activa influye en otros procesos biológicos como la germinación, la inducción floral y el fototropismo, modulando la respuesta de las plantas a las

variaciones ambientales y permitiendo su adaptación a diferentes condiciones de luz (Ouzounis et al., 2015).

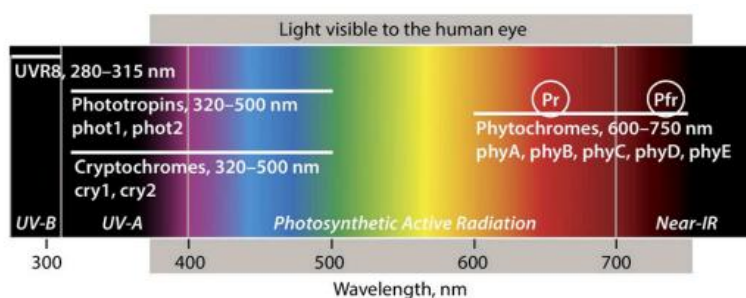


Figura 1. Rango de longitudes de onda percibidas por los principales fotorreceptores de las plantas. Imagen extraída de Ouzounis et al., 2015.

Dentro del rango de luz visible, cada tipo de luz o longitud de onda tiene un papel diferencial en el desarrollo. La luz azul (450-495 nm) desempeña un papel fundamental en la regulación de la apertura estomática y la fotosíntesis, mientras que la luz roja (620-700 nm) está implicada en la fotosíntesis y la floración. A su vez, la luz roja lejana (700-750 nm) también participa en los procesos de elongación, regulación del crecimiento y fotosíntesis (Zhen et al., 2021).

Cuando la luz solar incide sobre las plantas, los pigmentos fotosintéticos (clorofilas y carotenoides), absorben principalmente longitudes de onda que incluyen tanto luz azul (B) como roja (R). Mientras que la luz roja lejana (FR) se refleja y/o transmite a través de los tejidos vegetales (Smith, 1982; Ballare, 1999; Casal, 2012). Esto significa que la densidad de la población vegetal influye directamente en la calidad y cantidad de luz disponible. A medida que las plantas crecen y ocupan más espacio, el perfil de luz en el entorno se vuelve dinámico y la proporción de los diferentes espectros lumínicos varía. Por ello, tanto la radiación fotosintéticamente activa (PAR) como la proporción entre la luz roja y roja lejana (R:FR) son factores clave en la respuesta adaptativa de las plantas a su entorno.

En la naturaleza, las plantas se enfrentan a una amplia variedad de condiciones lumínicas, que van desde la exposición directa de la luz hasta sombras proyectadas por otras plantas.

Cuando las plantas se encuentran aisladas o en condiciones de baja densidad, reciben luz solar directa, la cual contiene una elevada PAR y un alto R:FR (Martínez-García et al., 2023). Sin embargo, un aumento en la densidad de la vegetación genera una bajada en R:FR a valores intermedios o bajos (<0.8) debido al incremento en la cantidad de luz FR proveniente del reflejo que genera la vegetación adyacente (Casal, 2012; Roig-Villanova & Martínez-García, 2016). Este descenso en R:FR es tanto un indicativo de la proximidad de otras plantas, como una alerta sobre la posible competencia por los recursos disponibles, lo que obliga a las plantas a ajustar sus estrategias de crecimiento y desarrollo para sobrevivir en un entorno más competitivo. La señal de bajada de R:FR sin cambios en PAR se denomina sombra de proximidad o *proximity shade*.

Además, las plantas pueden estar expuestas a una sombra dosel o *canopy shade*, que se produce cuando la luz que llega a la planta ha sido previamente absorbida y filtrada por plantas más altas. Este filtrado conlleva una reducción de PAR y valores muy bajos de R:FR (<0.1) (Smith, 1982; Yanovsky et al., 2000; Valladares & Niinemets, 2008; Ballare, 1999; Martínez-García et al., 2010; Casal, 2012,2013) (Figura 2).

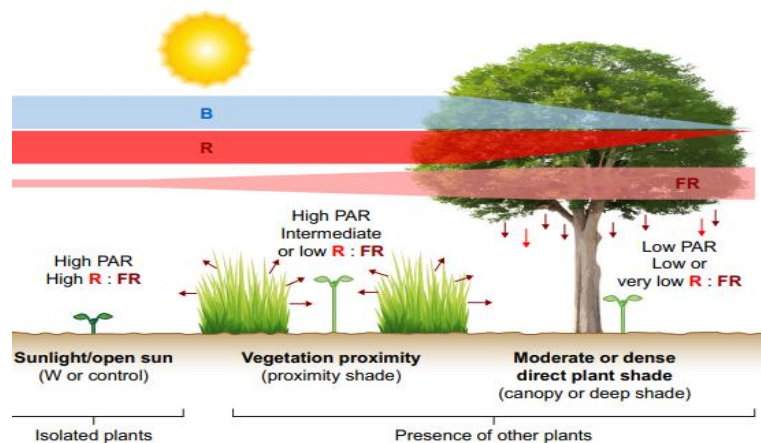


Figura 2. Características de la luz en situaciones de crecimiento aislado, proximidad de la vegetación y sombra de dosel. Imagen extraída de Martínez-García et al., 2023.

2. Efecto de la sombra en las plantas

La luz es un recurso imprescindible para el desarrollo y la supervivencia de las plantas. Como consecuencia, la evolución ha favorecido la aparición de mecanismos y estrategias que optimizan la captación lumínica y permiten a las especies vegetales adaptarse a las fluctuaciones de este recurso (Martínez-García et al., 2010).

Frente a una variación en la proporción de R:FR, las plantas han desarrollado diferentes estrategias evolutivas que les permiten hacer frente a la sombra provocada por competidores cercanos, bien evitándola o aumentando su tolerancia a esta.

La tolerancia a sombra hace referencia a la capacidad de una planta para tolerar condiciones de baja R:FR. Las plantas tolerantes son capaces de adaptarse a las condiciones lumínicas existentes mediante estrategias de crecimiento conservadoras y adaptaciones morfológicas y metabólicas (Valladares et al., 2008).

No obstante, la mayoría de las plantas desarrollan estrategias para evitar la sombra. Para lograrlo, reajustan su patrón de crecimiento y desarrollo, optimizando la captación de luz en entornos con una alta densidad de vegetación. Sin embargo, esta estrategia puede tener efectos adversos, ya que, al centrarse en promover el crecimiento para competir por la luz existente, su eficiencia fotosintética puede verse disminuida, así como su capacidad para defenderse frente a factores externos, como plagas o condiciones ambientales adversas (Sessa et al., 2018).

2.1 Plantas que evitan la sombra

La percepción de un bajo R:FR por parte de plantas que evitan la sombra lleva a desencadenar respuestas adaptativas, conocidas como síndrome de evitación o huida de la sombra (*Shade Avoidance Syndrome, SAS*, por sus siglas en inglés), que permiten a las plantas adaptarse y anticiparse a una posible situación de sombra y actuar para evitarla (Galstyan et al., 2011). Para lograr esto, la planta reajusta su crecimiento y desarrollo, promoviendo la elongación del tallo para sobrepasar a las plantas vecinas y así alcanzar una mayor cantidad de luz. Además, se produce un reajuste en la fotosíntesis en anticipación a posibles condiciones futuras de sombra (Morelli et al., 2021). Alternativamente, las especies vegetales sensibles a sombra pueden acelerar su ciclo de floración, asegurando la producción de semillas viables para la próxima generación, antes de que la sombra limite su crecimiento (Devlin et al., 2003).

En consonancia con estas respuestas, estas especies tienden a modificar su desarrollo para favorecer la extensión de los entrenudos, lo que les permite elongar rápidamente en condiciones de sombra. Este crecimiento en altura se da a expensas del desarrollo de las hojas, el cual queda en un segundo plano.

Además, estas plantas tienden a aumentar la dominancia apical, priorizando el crecimiento del tallo principal sobre la formación de ramas laterales. Estas adaptaciones permiten que las hojas jóvenes se desarrollen y escapen de las zonas sombreadas, maximizando así su exposición a la luz (Martinez-García et al., 2010).

En cuanto a la acumulación de pigmentos fotosintéticos, estas especies reducen su producción como mecanismo de ahorro de recursos, pero también como estrategia de adaptación de la fotosíntesis a las nuevas condiciones lumínicas (Morelli et al., 2021). Además, en respuesta a R:FR se prioriza el crecimiento vertical sobre la producción de pigmentos fotosintéticos (Smith, 2000; Franklin, 2005).

Dentro de las especies que evitan la sombra (es decir, que presentan el *SAS*), se encuentran la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y algunos de los principales cultivos, como el tomate (*Solanum lycopersicum*), y el guisante (*Medicago sativa*) (Warnasooriya & Brutnell, 2014).

2.2 Plantas tolerantes a sombra

En general, las especies tolerantes a sombra, bajo condiciones de baja luminosidad, emplean una estrategia conservadora en el uso de los recursos. Esto se traduce en tasas de crecimiento reducidas, acompañadas de cambios estructurales y bioquímicos destinados a optimizar la eficiencia en la conversión de energía fotosintética y a minimizar las pérdidas por respiración (Smith, 1982; Valladares y Niinemets, 2008).

Desde un punto de vista morfológico, las plantas tolerantes a sombra presentan características específicas cuando crecen en condiciones de poca luz. Entre estas, destaca una baja respuesta de elongación al reducirse la proporción R:FR, ya que no experimentan un crecimiento exagerado en altura para alcanzar la luz. También, muestran una reducción en la dominancia apical, que favorece una mayor ramificación y permite un crecimiento más equilibrado (Valladares y Niinemets, 2008). Por otro lado, tienden a conservar los órganos preexistentes, en lugar de producir constantemente nuevos tejidos y mantienen el contenido de pigmentos fotosintéticos, como clorofilas y carotenoides, que les permite maximizar la captación de luz disponible para la fotosíntesis.

3. Regulación molecular de la evitación a la sombra

Estudios llevados a cabo en *Arabidopsis thaliana* han permitido identificar los mecanismos a través de los cuales las plantas perciben los cambios en la cantidad (PAR) y calidad (R:FR) de la luz. Estos estudios han permitido aumentar la comprensión de la señalización hormonal, la expresión génica y los ajustes metabólicos que facilitan la adaptación de las plantas a entornos cambiantes de luz y sombra.

3.1 Percepción del cambio en R:FR: Fitocromos

A nivel molecular, las plantas perciben la luz a través de distintos tipos de fotorreceptores. Estos fotorreceptores detectan cambios en la composición de la luz, para posteriormente transducir la señal y regular así diversas respuestas fisiológicas y morfológicas.

Entre los principales fotorreceptores se encuentran los criptocromos (Cry), las fototropinas (PHOT), el UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) y los fitocromos (Phy) (Figura 1). Todos estos fotorreceptores participan en un proceso conocido como fotomorfogénesis, que le permite a las plantas ajustar su crecimiento y desarrollo ante un entorno lumínico cambiante (de Carbonnel et al., 2010).

Los criptocromos (cry1, cry2) y las fototropinas (phot1, phot2) absorben luz en la región del ultravioleta A al azul (Ahmad y Cashmore, 1993; Briggs y Huala, 1999; Christie y Briggs, 2001; Lin y Shalitin, 2003; Whitelam y Halliday, 2007) y participan en procesos como la regulación del ritmo circadiano, la fotomorfogénesis, la floración y el fototropismo. A su vez, el fotorreceptor UVR8 es el responsable de absorber la luz ultravioleta en el rango que va de 280 a 315 nm, lo que desencadena respuestas de estrés en las plantas (Jenkins, 2009; Kaiserli y Jenkins, 2007).

Los fitocromos son los fotorreceptores más estudiados en el control de la fotomorfogénesis, ya que son los responsables de absorber luz R y FR (Rajapakse et al., 1999). Estos fitocromos presentan dos isoformas fotoconvertibles: una forma inactiva, Pr, que no tiene actividad biológica, y una forma activa, Pfr, que desencadena procesos como la germinación de semillas, la elongación del tallo y la floración. Es por ello que cuando los fitocromos detectan una reducción en R:FR (Martinez-García et al., 2023), activan una cascada de señalización que alerta a la planta sobre la cercanía de otras, desencadenando así respuestas adaptativas.

En condiciones de oscuridad, estos fotorreceptores se sintetizan en el citoplasma en su forma inactiva, conocida como Pr, que absorbe principalmente R, con un máximo de absorción de 666 nm. Al absorber esta luz, el fitocromo Pr pasa a su forma activa, denominada Pfr, la cual absorbe FR, con un máximo de absorción de 730 nm (Martinez-García et al., 2010). Esta conversión a Pfr, activa una señal que permite el desplazamiento del fitocromo al núcleo, donde se desencadenan una serie de respuestas biológicas (Nagatani, 2004). Este ciclo de fotoconversión reversible y dinámico entre Pr y Pfr, permite a los fitocromos actuar como interruptores moleculares en la regulación de las respuestas a la luz. A su vez, esta dinámica también los hace susceptibles a mecanismos de degradación como respuesta adaptativa (Bae and Choi, 2008; Franklin, 2008).

En ambientes con un alto R:FR, los fitocromos tienden a mantenerse en su forma activa, Pfr. Esto inhibe las respuestas asociadas al SAS. En cambio, en entornos donde predomina un bajo R:FR, el fitocromo se desplaza hacia su forma inactiva, Pr. Esta transición desencadena respuestas adaptativas en la planta, como el SAS.

En *Arabidopsis thaliana*, la familia de los fitocromos consta de cinco miembros, denominados (PHYA-PHYE). Estos regulan procesos dependientes de la luz como la germinación, la desetiación, el desarrollo de los estomas y la transición a la floración (Martinez-García et al., 2023). Entre ellos, destacan phyB y phyA por su papel en la regulación del crecimiento ante variaciones en R:FR (Figura 3).

El phyA es fotolábil, es decir inestable bajo condiciones de luz, lo que hace que frente a un elevado R:FR este se degrade. Esta rápida degradación permite que phyA desempeñe su papel en las respuestas iniciales y transitorias a la exposición de FR. Sin embargo, la inestabilidad de este fitocromo limita su actividad a posteriori (Chen et al., 2004; Leivar and Quail, 2011). Sin embargo, en condiciones de sombra de proximidad, se acumula y modera la respuesta de elongación, ayudando a la planta a responder de manera controlada (Martinez-Garcia et al., 2000; Yang et al., 2018; Molina-Contreras et al., 2019).

El phyB desempeña un papel crucial en la regulación del crecimiento del hipocótilo en respuesta a sombra. En condiciones de sombra, phyB se inactiva e induce las respuestas adaptativas a sombra, como la elongación del hipocótilo (Bae y Choi, 2008).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, una vez que los fitocromos se encuentran en su forma activa (Pfr), se trasladan al núcleo de la célula, donde interactúan con los factores de transcripción, denominados PIFs. Estos factores de transcripción participan en una amplia variedad de procesos biológicos.

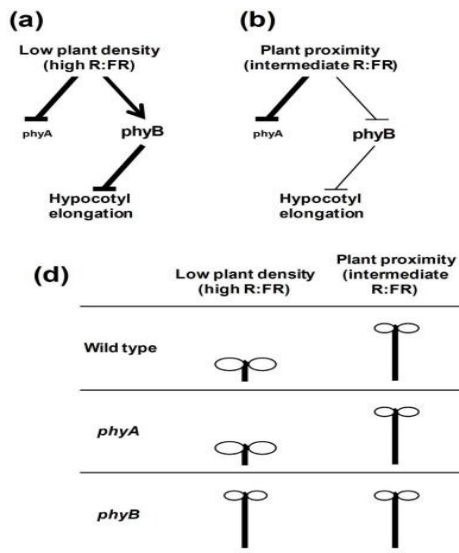


Figura 3. Modelo que representa el efecto antagónico de *phyA* y *phyB* inducido por la sombra en la elongación del hipocótilo. Imagen extraída de Martínez-García et al., 2014.

3.2 Transducción de la señal: PIFS

3.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Los PIFs pertenecen a la superfamilia de factores de transcripción conocidos como helix-loop-helix (bHLH) (Ni et al., 1998), los cuales constan de dominios cortos en el extremo N-terminal que les permiten interactuar con las formas activas de los fitocromos. Esta interacción inactiva a los PIFs, impidiendo que regulen la expresión de sus genes diana.

Los PIFs se unen preferentemente a secuencias específicas en el promotor de sus genes diana, conocidas como G-box (CACGTG) y PBE-box (CACATG). La estructura de las regiones promotoras de estos genes diana puede variar, ya que pueden contener desde uno a múltiples sitios de unión para los PIFs, con uno o más motivos G-box o PBE-box. Esta variabilidad en la estructura de los promotores hace que estos genes consten de una regulación flexible y compleja que facilita la adaptación de las plantas a diversas condiciones ambientales (Pfeiffer et al., 2014).

Los PIFs regulan genes implicados en la adaptación de las plantas a diferentes condiciones de luz, en procesos como la fotomorfogénesis, la germinación de semillas y el alargamiento del hipocótilo (Leivar y Monte, 2014; Pham et al., 2018).

En *Arabidopsis thaliana*, existen siete miembros de la familia PIF: PIF1, PIF3, PIF4, PIF5, PIF6, PIF7 y PIF8. Todos estos miembros interactúan con la forma activa de phyB, pero solo PIF1 y PIF3 tienen la capacidad de interactuar con phyA (Leivar and Quail, 2011).

Cuando los fitocromos se activan, interaccionan los PIFs y provocan su fosforilación (Shen et al., 2005, 2008; Bu et al., 2011b; Park et al., 2012). La fosforilación implica la adición de grupos fosfato a las proteínas, lo que, por consiguiente, puede alterar su actividad, estabilidad o localización dentro de la célula. Esta modificación es crucial para regular el papel de los PIFs en la respuesta a la luz. La fosforilación de los PIFs del grupo conocido como cuarteto PIF o PIFQ (PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5), los cuales son fotolábiles, provoca su ubiquitinación, que consiste en la unión de ubiquitina, marcando así estas proteínas para su degradación.

Mediante este proceso, el proteasoma, complejo enzimático responsable de descomponer y reciclar proteínas no deseadas o dañadas, reconoce y elimina los PIFs. Sin embargo, la fosforilación de PIF 7 y PIF8 de *Arabidopsis*, que son considerados fotoestables, impide su unión a genes diana, pero no su degradación. En el caso de PIF7, su interacción con los fitocromos induce a su fosforilación y posterior

asociación con las proteínas 14-3-3, proteínas reguladoras capaces de interactuar selectivamente con proteínas fosforiladas y regular diversos procesos fisiológicos (Adams et al., 2014), las cuales lo retienen en el citosol, impidiendo su activación como factor de transcripción (Huang et al., 2016).

Aunque PIF8 está menos caracterizado (Simón-Moya et., 2021), se presupone que presenta una estabilidad similar a la de PIF7.

En condiciones de R:FR alto, el phyB se activa y desencadena la fosforilación de PIFs. Esta modificación puede resultar en la degradación de los PIFs o en su incapacidad para unirse al DNA, lo que suprime su actividad transcripcional y, por ende, limita la expresión de los genes asociados al crecimiento (Li et al., 2012; Kohnen et al., 2016). Sin embargo, en condiciones de R:FR bajo (sombra), el phyB se inactiva y provoca la desfosforilación de los PIFs. Esta desfosforilación permite que los PIFs se acumulen y/o activen, lo que a su vez promueve la expresión de genes involucrados en las respuestas del SAS.

PIF7, y en menor medida PIF4 y PIF5, son los principales responsables de desencadenar respuestas de elongación mediadas por la sombra en *Arabidopsis*, PIF1 y PIF3 son los principales implicados en reprimir la síntesis de clorofilas y carotenoides y, en general, el desarrollo fotosintético (Figura 4).

Dado que el presente estudio se enfoca en los procesos que se ven afectados por la sombra, es esencial centrarse en los PIFs que están directamente involucrados en esta respuesta.

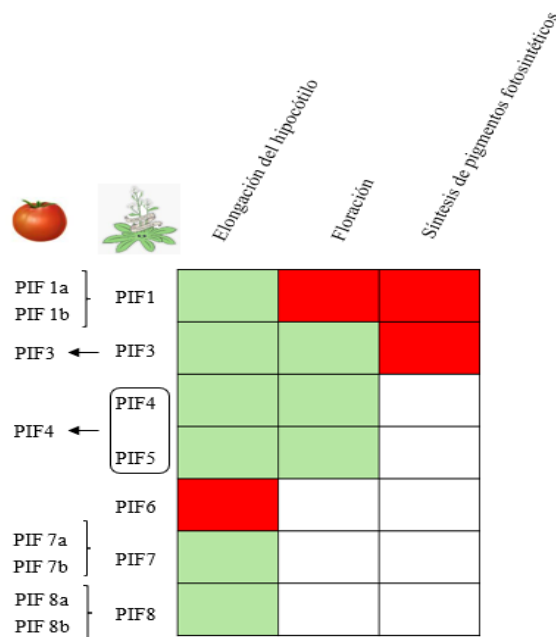


Figura 4. Rol de los PIFs en *Arabidopsis* y homología en *Solanum lycopersicum*. Los cuadrados verdes indicando un rol promotor y los rojos un rol represor.

3.2.2. Tomate (*Solanum lycopersicum*)

La familia PIF también ha sido estudiada en tomate (*Solanum lycopersicum*). En esta especie la familia consta de 8 genes: PIF1a, PIF1b, PIF3, PIF4, PIF7a, PIF7b, PIF8a y PIF8b (Rosado et al., 2016; Oh et al., 2020). En este caso, mientras que los homólogos de PIF6 no se encuentran en el genoma del tomate, los homólogos de PIF1, PIF7 y PIF8 están duplicados (Figura 4). Según Rosado *et al.* (2016), se cree que los PIFs mencionados anteriormente están duplicados debido a un proceso de poliploidización completa del genoma del tomate, seguido de un proceso de selección positiva que mantuvo estas duplicaciones. Por otro lado, los otros miembros de la familia, los cuales permanecen como genes de copia única, podrían haberlo hecho por una pérdida aleatoria de genes o por la falta de presión selectiva sobre ellos.

Arabidopsis consta de PIF4 y PIF5 mientras que en tomate solo hay PIF4 (Llorente *et al.*, 2016b).

La caracterización de los PIFs en tomate no ha sido tan amplia como en *Arabidopsis*, por lo que solo alguno de estos genes ha sido caracterizado y se ha comenzado a conocer su contribución en la respuesta a sombra y en la regulación de los procesos metabólicos involucrados en esta condición.

De los dos homólogos de PIF1 en tomate, solo PIF1a ha sido caracterizado (Llorente *et al.*, 2016b). Las clorofilas presentes en las capas externas del fruto verde ejercen en efecto de “autosombra” al filtrar R y dejar pasar FR al interior del fruto. Esto genera una bajada de R:FR y por tanto una acumulación de PIF1a y una represión de la síntesis de carotenoides. Sin embargo, la maduración del fruto conlleva la degradación de estas clorofilas, hecho que hace aumentar la proporción R:FR de la luz que penetra en el fruto, lo que disminuye la estabilidad proteica de PIF1a e induce a su degradación, promoviendo la síntesis de carotenoides (Llorente *et al.*, 2016b, 2016a; Fray and Grierson, 1993; Fantini *et al.*, 2013; Giorio *et al.*, 2008).

Por otro lado, PIF3 se encarga de regular la biosíntesis de tocoferoles en los frutos de tomate (Gramegna *et al.*, 2018).

PIF4 regula la senescencia de las hojas y la floración, así como la maduración de los frutos. Además, el silenciamiento está asociado a un aumento en la acumulación de carotenoides (Rosado *et al.*, 2019).

Según Oh *et al.*, 2020 en tomate PIF7 tiene un papel fundamental en la regulación de la respuesta a la luz en procesos como la desetiación y la senescencia. A diferencia de otros factores de transcripción, PIF7 es fotoestable, y no se degrada en presencia de luz. Además, su expresión aumenta en presencia de sombra hecho que indica su posible implicación en los mecanismos de adaptación a sombra, como la elongación del hipocótilo.

En cuanto a PIF8, la información referente a su implicación en la respuesta a sombra es limitada. Sin embargo, estudios como el de Oh *et al.*, 2020, sugieren que este factor de transcripción está implicado en la regulación de la elongación del hipocótilo bajo estas condiciones. Aunque probablemente no juega un papel tan significativo en esta respuesta ya que en condiciones de oscuridad se degrada, hecho que indica que su actividad está regulada por la luz.

4. Creando plantas tolerantes a sombra

Cardamine hirsuta es un claro ejemplo de especie tolerante a sombra y se ha comprobado que al menos parte de su tolerancia a sombra se debe a una menor actividad PIF (Martinez-Garcia *et al.*, 2023).

En plantas tolerantes a la sombra, como *Cardamine*, se observa una menor actividad de los PIFs. Esta característica permite que las plantas tolerantes a la sombra eviten respuestas como la elongación del hipocótilo en condiciones de bajo R:FR, una estrategia clave para adaptarse a entornos sombreados (Galstyan *et al.*, 2011; Molina-Contreras *et al.*, 2019). Además, el papel de la proteína LONG HYPOCOTYL IN FR 1 (HFR1) ha sido identificado como un regulador esencial en esta adaptación. Aunque estructuralmente es similar a los PIF, HFR1 no puede unirse ni al ADN ni al phyB, pero forma heterodímeros con los PIF, bloqueando su actividad y modulando así las respuestas de adaptación a la sombra (Galstyan *et al.*, 2011; Hornitschek *et al.*, 2012).

Por el contrario, en plantas que evitan la sombra, como *Arabidopsis*, los PIF están activos y promueven la elongación del hipocótilo en respuesta a la sombra. Sin embargo, investigaciones previas han demostrado que es posible transformar estas plantas en tolerantes a la sombra al reducir o eliminar la actividad de ciertos PIF, como PIF7 o el grupo PIFQ (PIF1, PIF3, PIF4 y PIF5). Por ejemplo, en plantas mutantes para PIF7, la elongación del hipocótilo se ve inhibida incluso bajo condiciones de sombra, lo que evidencia el papel central de PIF7 en la respuesta SAS (Paulisic *et al.*, 2021).

El análisis comparativo entre *Cardamine* y *Arabidopsis* ha permitido identificar las bases genéticas y moleculares de la tolerancia a la sombra. En *Cardamine*, los niveles elevados de HFR1 y la baja expresión de PIF7 contribuyen de manera sinérgica a la tolerancia a la sombra. Además, la estabilidad de HFR1 en esta especie parece estar regulada por mecanismos postraduccionales que limitan su degradación, lo que prolonga su actividad funcional (Molina-Contreras et al., 2019). Por otro lado, en *Arabidopsis*, la actividad de los PIFs predomina, lo que facilita las respuestas de elongación características de plantas que evitan la sombra.

Tabla 1. Características y diferencias clave entre PIF y HFR1.

	PIFs	HFR1
Función	Reguladores positivos del crecimiento en sombra	Regulador negativo del crecimiento en sombra, antagoniza a los PIFs
Fotolabilidad	Se degradan en condiciones de luz, excepto PIF7 y PIF8	No son fotolábiles
Interacción molecular	Interactúan con los fitocromos, activando genes de elongación	Forma heterodímeros con los PIFs; inhibiendo su actividad
Procesos asociados	Germinación, elongación, síndrome de evitación de sombra	Limitación del crecimiento en sombra
Regulación	Sistema ubiquitina-proteasoma	Sistema ubiquitina-proteasoma

En *Arabidopsis thaliana*, diversos estudios han demostrado que las mutaciones en los PIFs, que pueden ir desde mutaciones simples hasta mutaciones cuádruples (*pifq*), desencadenan una serie de respuestas moleculares y fenotípicas asociadas con la tolerancia a la sombra, siendo la reducción en la elongación del hipocótilo una de las más destacadas. Estas observaciones sugieren que mutar los PIFs en tomate también podría resultar en una menor respuesta a la sombra por parte de este cultivo. Este enfoque permitiría desarrollar variedades con una mejor adaptación a ambientes sombreados, lo cual sería relevante para optimizar la producción agrícola en cultivos densos o en regiones con limitaciones de luz. Además, estas nuevas variedades podrían servir como un modelo para estudiar los efectos fisiológicos y genéticos asociados a la tolerancia a la sombra en especies cultivadas.

OBJETIVOS

Este trabajo se planteó para estudiar si mutantes de tomate deficientes en PIFs presentan fenotipos de tolerancia a sombra. Para estudiar esta hipótesis, se parte de unos mutantes previamente generados mediante la tecnología CRISPR/Cas9, obtenidos tanto en el laboratorio como a través de la colaboración con otros investigadores. A partir de estas líneas mutantes, se han definido los siguientes objetivos:

1. Identificar líneas homocigotas que presenten pérdida de función en algunos PIFs.
2. Evaluar como responden los mutantes identificados a la sombra, a nivel molecular y fenotípico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para la realización de este proyecto se han utilizado dos variedades de tomate (*Solanum lycopersicum*): Micro-Tom y M82.

Micro-Tom es una variedad que resulta del cruce entre *Florida Basket* y *Ohio 4013-3* (Scott et al., 1989). Este cultivar es considerado una planta modelo en investigación debido a sus propiedades distintivas, entre las que cabe destacar su tamaño reducido (15-20 cm de altura) que favorece su cultivo en alta densidad (1,357 individuos/m²). Además, presenta un ciclo de vida corto (70-90 días) y es fácil de editar genéticamente. Debido a estas características, Micro-Tom se ha utilizado como fondo de genético para la generación de líneas transgénicas de diferentes genes de la familia de los PIFs mediante la tecnología de CRISPR-Cas9. Las líneas de pérdida de función de *pif1a*, *pif1b*, *pif1a/1b* y *pif7a/7b* fueron generadas previamente en el laboratorio de Manuel Rodríguez Concepción (Tabla 2).

M82 es una variedad comercial de tomate que es ampliamente utilizada para la realización de estudios genéticos debido a la elevada robustez que presenta, la cual le otorga una alta capacidad de adaptación a condiciones controladas. Además, esta variedad muestra una producción elevada y estable. Ambas características hacen de esta variedad una excelente candidata para la realización de ensayos de respuesta a diferentes condiciones ambientales.

La variedad M82 se ha utilizado como fondo genético para la generación de varias líneas transgénicas con genes pertenecientes a la familia de los PIFs mediante la tecnología de CRISPR-Cas9. La línea de pérdida de función de *pif7b* utilizada en este proyecto se generó previamente en el laboratorio de Manuel Rodríguez-Concepción. Mientras que las líneas *pif8a*, *pif7a/7b*, *pif4/7a/7b (pift)* y *pif4/7a/7b/8a (pifq)* fueron generadas y cedidas por el laboratorio de Yogev Burko (Agricultural Research Organisation Volcani Center, Israel) (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización de las líneas de tomate empleadas.

Líneas transgénicas	Fondo	Tipo de mutante	Generado por
<i>pif1a</i>	MT	Líneas de pérdida de función generadas mediante la tecnología CRISPR/Cas9.	Miguel Simón
<i>pif1b</i>	MT		Miguel Simón
<i>pif1a/1b</i>	MT		Miguel Simón
<i>pif7b</i>	M82		Esteban Burbano
<i>pif7a/7b</i>	MT		Esteban Burbano
<i>pif8a</i>	M82		Yogev Burko
<i>pif7a/7b</i>	M82		Yogev Burko
<i>pif4/7a/7b (pift)</i>	M82		Yogev Burko
<i>pif4/7a/7b/8a (pifq)</i>	M82		Yogev Burko

Todas las plantas de tomate utilizadas durante el proyecto se germinaron y crecieron en condiciones controladas en las instalaciones del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia.

Para evitar contaminaciones, al empezar cualquier ensayo, se esterilizaron las semillas mediante una limpieza con lejía al 40% + 0,5% de Tween 20, seguido de tres limpiezas consecutivas con H₂O durante 5 min. Las semillas estériles se sembraron en placas de Petri con medio sólido MSx0,5 (Murashige y Skoog), sin vitaminas, se cubrieron con papel de aluminio para protegerlas contra la luz y se transfirieron, durante cuatro días, a cabinas de crecimiento *in vitro*, en condiciones climáticas controladas, a 24°C e iluminadas con luz fluorescente blanca (Tabla 3). Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a tierra (tiesto) y crecidas, en un fitotrón de los invernaderos del IBMCP, en condiciones estándar de día largo (16h de luz a 24°C y 8h de oscuridad a 24°C).

Tabla 3. Condiciones lumínicas de la cámara de crecimiento.

PAR	78.72	76.35
Luz azul (B)	0.44	0.43
Luz roja (R)	5.90	5.70
Luz roja lejana (FR)	0.14	0.14
R/FR	42.14	40.71

Las condiciones de baja densidad (LD, *low density*) y alta densidad (HD, *high density*), también denominadas condiciones de luz y de sombra respectivamente, fueron simuladas en el fitotrón mediante la modificación de las condiciones lumínicas. La condición de baja densidad se corresponde con condiciones de luz blanca (W) con un PAR promedio de 137 y una ratio de luz roja-rojo lejana de 4.81 (Tabla 4). Mientras que la condición de alta densidad se obtiene mediante la combinación de luz blanca y luz roja lejana (W+FR), la cual se caracteriza por un PAR promedio de 127 y una ratio rojo-rojo lejano de 0.13 (Tabla 5). Mediante estas condiciones lumínicas se ha intentado recrear las condiciones de luz y sombra que las plantas experimentan en la naturaleza.

Tabla 4. Condiciones lumínicas en W.

W	Parte delantera	Medio	Parte trasera
PAR	146.32	146.91	118.12
Luz azul (B)	0.55	0.56	0.45
Luz roja (R)	4.21	4.29	3.47
Luz roja lejana (FR)	0.86	0.87	0.73
R/FR	4.84	4.88	4.72

Tabla 5. Condiciones lumínicas de W+FR.

W+FR	Parte delantera	Medio	Parte trasera
PAR	126.88	141.06	113.64
Luz azul (B)	1.33	1.55	1.08
Luz roja (R)	3.37	4.07	3.36
Luz roja lejana (FR)	27.41	33.02	20.86
R/FR	0.12	0.12	0.16

Otra de las formas de simular las diferentes condiciones de densidad, baja densidad (LD) y alta densidad (HD), es siguiendo la distribución de las plantas que se observa en la Figura 5, siendo los puntos verdes los alveolos en los que se ponen a crecer las plantas a analizar.

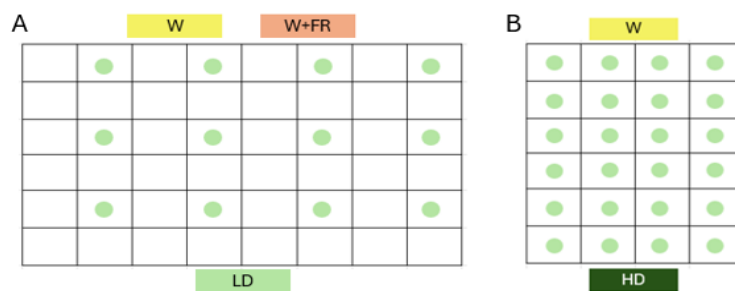


Figura 5.A) Crecimiento de las plantas en baja densidad, tanto en condiciones de luz blanca (W) como en condiciones de sombra (W+FR). B) Crecimiento de las plantas en alta densidad en condiciones de luz blanca (W). Los puntos verdes indican donde se han sembrado las plantas control.

Una vez en tiesto y transferidas al fitotrón, durante los primeros tres días, todas las plantas crecen en condiciones de luz blanca (W). Posteriormente, para la determinación de la elongación del hipocótilo, permanecen durante 11 días, la mitad de las plantas de cada genotipo de estudio en condiciones de luz blanca (W) y la otra mitad se transfieren a la condición que simula una alta densidad, la cual combina luz blanca y luz roja-lejana (W+FR).

Transcurridos estos 11 días se procede al análisis de las muestras mediante la medición del contenido de clorofilas con el SPAD, la medición de parámetros fotosintéticos con el LICOR, la toma de fotografías para la posterior medición de los hipocótilos, el internodo 1 y el área foliar. Así como también se procede a la recolección de muestras de hoja para la posterior medición de pigmentos fotosintéticos mediante HPLC.

Extracciones de DNA

La extracción de las muestras para el posterior genotipado se realizó a partir de muestras de hoja joven siguiendo un protocolo de lisis mediante sales. El material se trituró mediante el TissueLyser (Qiagen), fue digerido con buffer TNES (Tris-HCl 200mM pH 7.5-8, NaCl 25mM, EDTA 25mM pH 7.5-8 y 0.5% de SDS) durante 1 min y posteriormente se realizaron las limpiezas con isopropanol y etanol al 70%.

Genotipado y secuenciación

Los genotipados realizados para el análisis de secuencias de las plantas T3 del doble mutante de *pif7a/7b* de MT, así como el genotipado de la Cas9 para estas mismas plantas, y el genotipado de los alelos de *pif7a* de MT fueron realizados mediante PCR utilizando la *GreenTaq DNA Polymerase* (NZY) y los primers indicados en la Tabla 6, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las PCRs se realizaron en termocicladores Classic K960 (Heal Force) y la amplificación fue posteriormente verificada mediante geles de agarosa al 1%.

Las muestras destinadas a la secuenciación, una vez genotipadas, fueron purificadas mediante el kit de purificación *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron secuenciadas mediante Sanger para la detección de posibles mutaciones a nivel de secuencia (SNPs e INDELS).

Tabla 6. Primers utilizados.

PIF7a genoCRISPR F	Forward	CGAAAGAACACATGGTACATC
PIF7a genoCRISPR R SEQ	Secuenciación	GTAATGTCAGAGCCAGGAC
PIF7a genoCRISPR R	Reverse	GTAAGTACTCCACTAGCTAGC
PIF7b genoCRISPR F	Forward	CATAGCTAATGTGGCAGTC
PIF7b genoCRISPR R SEQ	Secuenciación	GCGTAACTAGTGAGTTCATG
PIF7b genoCRISPR R	Reverse	GCACCAAAACCAAACAAAAC

El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante la plataforma Benchling, la cual permite el análisis de los cromatogramas y el alineamiento (MAFFT) de nuestras secuencias “*problema*”, empleando una secuencia control conocida para la identificación de posibles mutaciones a nivel de secuencia.

Fenotipado

Las imágenes utilizadas para la medición de la elongación del hipocótilo y del internodo 1, así como para la medición del desarrollo del área foliar fueron tomadas con un Google Pixel 7 tras los 11 días de tratamiento en condiciones de luz blanca (W) y en condiciones de sombra o alta densidad (W+FR). Para el análisis del área foliar se tomaron fotos individuales de cada planta (Imagen Xa). Sin embargo, para la medición del hipocótilo y del internodo 1 (Imagen Xb) se tomaron fotos grupales (mismo genotipo y tratamiento lumínico), utilizando siempre una regla de 15 cm como escala de la imagen.

El análisis de estas imágenes se ha realizado utilizando el software *ImageJ*, el cual permite procesar y cuantificar datos obtenidos a partir de imágenes, como serían la longitud y el área en nuestro caso. Previo a la obtención de estos datos, es necesario calibrar la imagen y aplicarle una escala, la cual obtenemos mediante la medición de la regla de 15cm, presente en todas las imágenes tomadas. Este programa permite medir con precisión las dimensiones y calcular el área foliar mediante técnicas de segmentación de la imagen.

Medición del contenido de clorofilas

La medición del contenido de clorofilas se realiza mediante el equipo SPAD 502 Plus, el cual permite hacer mediciones instantáneas y no invasivas del contenido de clorofila, reduciendo el riesgo de deficiencias en el rendimiento de las plantas. Para realizar las mediciones, el equipo se coloca directamente sobre el tejido foliar, seleccionando siempre las hojas más jóvenes (área de medición: 2 mm x 3 mm).

Este equipamiento realiza las mediciones del contenido foliar utilizando dos LED como fuente de luz y mediante la diferencia de densidad óptica de dos longitudes de onda, 650 nm y 940 nm.

Medición del rendimiento fotosintético

Los distintos parámetros fotosintéticos son tomados mediante el uso del equipo LI-600 (LICOR®). El LI-600 es un porómetro portátil que combina la medición de la conductancia estomática y la fluorescencia de clorofila a en una misma área foliar. Funciona mediante un sistema de flujo abierto diferencial que permite cuantificar la transpiración (E), midiendo la tasa de flujo y la fracción molar de vapor de agua en el aire que entra y sale de la cámara del dispositivo. A partir de estos datos, se calcula la conductancia estomática (gsw) considerando la conductancia total del vapor de agua (gtw) y la conductancia de la capa límite del vapor de agua (gbw).

Durante el proceso, al igual que en la medición de la acumulación de clorofilas, se seleccionan las hojas más jóvenes para garantizar resultados representativos y consistentes.

De todos los parámetros que toma este equipo, nosotros nos focalizamos principalmente en el rendimiento fotosintético (PhiPS2).

Extracción y análisis de metabolitos

Para la extracción de clorofilas y carotenoides en muestras de hoja verde se partió de 4 mg de muestra en polvo (muestra previamente liofilizada) en tubos de 2mL con 2-3 bolas de cristal. Para la extracción de metabolitos se añadieron 20 µl de patrón y 980 µl de una solución de hexano, acetona y metanol (2:1:1) a cada muestra, seguido de 1 min de Tissuelyser a 30Hz para proceder a la lisis tisular. Se añadieron 400 µl de Tris-NaCl (pH=7.5), seguido de 1 min de Tissuelyser a 30Hz. Se añadieron 800 µl de cloroformo, se aplicó 1 min de Tissuelyser a 30Hz y se centrifugó durante 5 minutos a 4°C y a 13000

rpm para la separación de la fase orgánica (fase inferior), la cual se evaporó posteriormente en el Speedvac durante 40 min. Las muestras se resuspendieron en 150 µl de acetona y se filtraron con un filtro de 0.2 µl en viales de cristal de 2 mL de color ámbar.

La separación y detección de los compuestos se realizó a partir de 10 µl de las muestras mediante la Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies). Se utilizó una columna C30 de fase-reversa (YMC Carotenoid, 250x4,6mmx3um) con tres fases móviles – metanol (A), H₂O/metanol (20/80, v/v) con 0,2% de acetato de amonio (B) y tert-metil butil éter (C). Los metabolitos se separaron siguiendo el siguiente gradiente: 95% A y 5% B de forma isocrática hasta el minuto 12, seguido de la configuración 80% A, 5% B y 15% C a partir de los 12', la cual aumenta de forma lineal hasta llegar a 30% A, 5% B y 65% C a los 30 minutos. La relación del flujo se mantuvo a 1mL/min. El equipo de HPLC constaba de un detector de array de diodo fotométrico que permite la detección de los diferentes clorofilas y carotenoides dentro del espectro de luz visible. La visualización de los cromatogramas y el análisis de los datos se realizó utilizando el software Agilent ChemStation.

Microscopia

Mediante el Macroscopio Leica DMS 1000 con iluminación diascópica se visualizaron y capturaron imágenes de los pelos radicales de las plántulas mutantes de PIF1 una semana después de su germinación.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos de este trabajo (ANOVAs y T-test) han sido realizados con Excel (Microsoft Office) y RStudio. Excel se ha utilizado para la ejecución de análisis básicos y cálculos preliminares. Mientras que con RStudio se han realizado las gráficas y los análisis estadísticos (T-test y ANOVA de dos factores) para la evaluación de las posibles diferencias entre genotipos y tratamientos.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA SOMBRA EN LA VARIEDAD M82

El efecto de la sombra en tomate se evaluó inicialmente utilizando la variedad comercial M82. Una de las respuestas más características del SAS es la estimulación del crecimiento por elongación, observada tanto en condiciones de sombra natural como en ensayos de invernadero donde se simula una baja proporción R:FR (Child & Smith 1987).

Además de la elongación del hipocótilo y del primer internodo (llamado también epicotilo), el SAS afecta a aspectos como el desarrollo del área foliar, que en el caso del tomate se ve aumentada, ampliando así la superficie para la captación de luz disponible (McLaren & Smith, 1978). La disminución del R:FR, también puede generar una disminución en la producción de clorofilas y carotenoides, lo que resulta en hojas de color más pálido y un menor rendimiento fotosintético.

Para contrastar esta información y evaluar la respuesta SAS de las plantas de tomate con fondo genético M82, se diseñó un experimento con dos maneras de generar la señal de sombra de proximidad. Por una parte, se compararon plantas crecidas en condiciones de luz blanca (W, alto R:FR) o en luz blanca complementada con FR para simular la sombra de proximidad (W+FR, bajo R:FR). La proporción R:FR bajo las condiciones de W fue de 4.88, mientras que en las condiciones de sombra simulada (W+FR) se redujo a 0.12 debido al incremento de FR, manteniendo en ambos casos un PAR aproximado de 146.91.

Todas las plantas fueron germinadas y crecidas en W durante 3 días. Tras este periodo, una parte de las plantas se mantuvo bajo las mismas condiciones, mientras que la otra parte fue transferida a condiciones de sombra simulada (W+FR) durante 11 días (Figura 6). Al finalizar este periodo, se llevaron a cabo las mediciones de las distintas variables estudiadas.

Por otro lado, se crecieron plantas en W a baja densidad (LD, alto R:FR) o alta densidad (HD, bajo R:FR) durante el mismo periodo de tiempo (Figura 6). Este experimento no solo permitió analizar el efecto combinado de ambos tratamientos sobre el crecimiento temprano de las plantas en condiciones controladas, sino que también permitió establecer un paralelismo con las condiciones que se dan en el campo, ya que en los cultivos agrícolas la sombra de proximidad viene dada por las plantas que suelen crecer en alta densidad, hecho que las expone a señales lumínicas similares a las simuladas en este experimento.

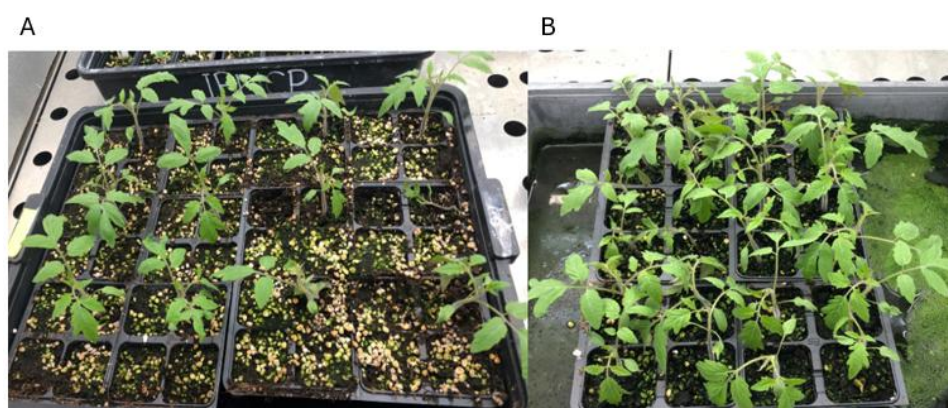


Figura 6. A) Crecimiento de las plantas en baja densidad, tanto en condiciones de W como en condiciones de sombra simulada (W+FR). B) Crecimiento de las plantas en alta densidad en condiciones de W.

a) Respuestas de crecimiento

El efecto de ambos tratamientos, tratamiento lumínico y de densidad, en el crecimiento de las plantas se determinó mediante el análisis fenotípico de la elongación del hipocótilo, el primer internodo (o epicotilo) y el área foliar (Figura 7).

En condiciones de LD, las plantas sometidas a W+FR mostraron una elongación del hipocótilo significativamente mayor ($P_{\text{valor}}:0.01$) a la de las plantas expuestas a W (45 vs 38 mm), hecho que sugiere una respuesta adaptativa al tratamiento de sombra simulada. Por otro lado, al comparar las plantas cultivadas a distintas densidades (LD y HD) no se observaron diferencias significativas ($P_{\text{valor}} = 0.15$) en la elongación del hipocótilo (LD: 38 mm; HD: 35 mm) (Figura 7A).

En cuanto a la elongación del primer internodo, las plantas sometidas al tratamiento de W+FR mostraron una longitud significativamente mayor ($P_{\text{valor}}:0.001$) que las expuestas a W (19 vs 12 mm); hecho que indica que las plantas responden a la sombra simulada elongando sus entrenudos como mecanismo adaptativo. En cambio, la elongación del primer internodo en condiciones de HD es muy similar a la que presentan las plantas que han crecido en LD bajo W ($P_{\text{valor}}: 0.1$) (Figura 7B).

En cuanto al desarrollo del área foliar, los resultados son consistentes con los descritos de alargamiento del hipocótilo y el primer internodo, ya que muestran diferencias estadísticamente significativas ($P_{\text{valor}}: 0.05$) con el tratamiento de sombra simulada (W+FR vs W) pero no con la densidad (HD vs LD). En concreto, se midió una mayor área foliar en las plantas crecidas en (W+FR) con respecto a los controles en W (3500 mm² vs 2500 mm²), mientras que el tratamiento de densidad no tiene un efecto significativo sobre el área foliar ($P_{\text{valor}}: 0.1$) (Figura 7C).

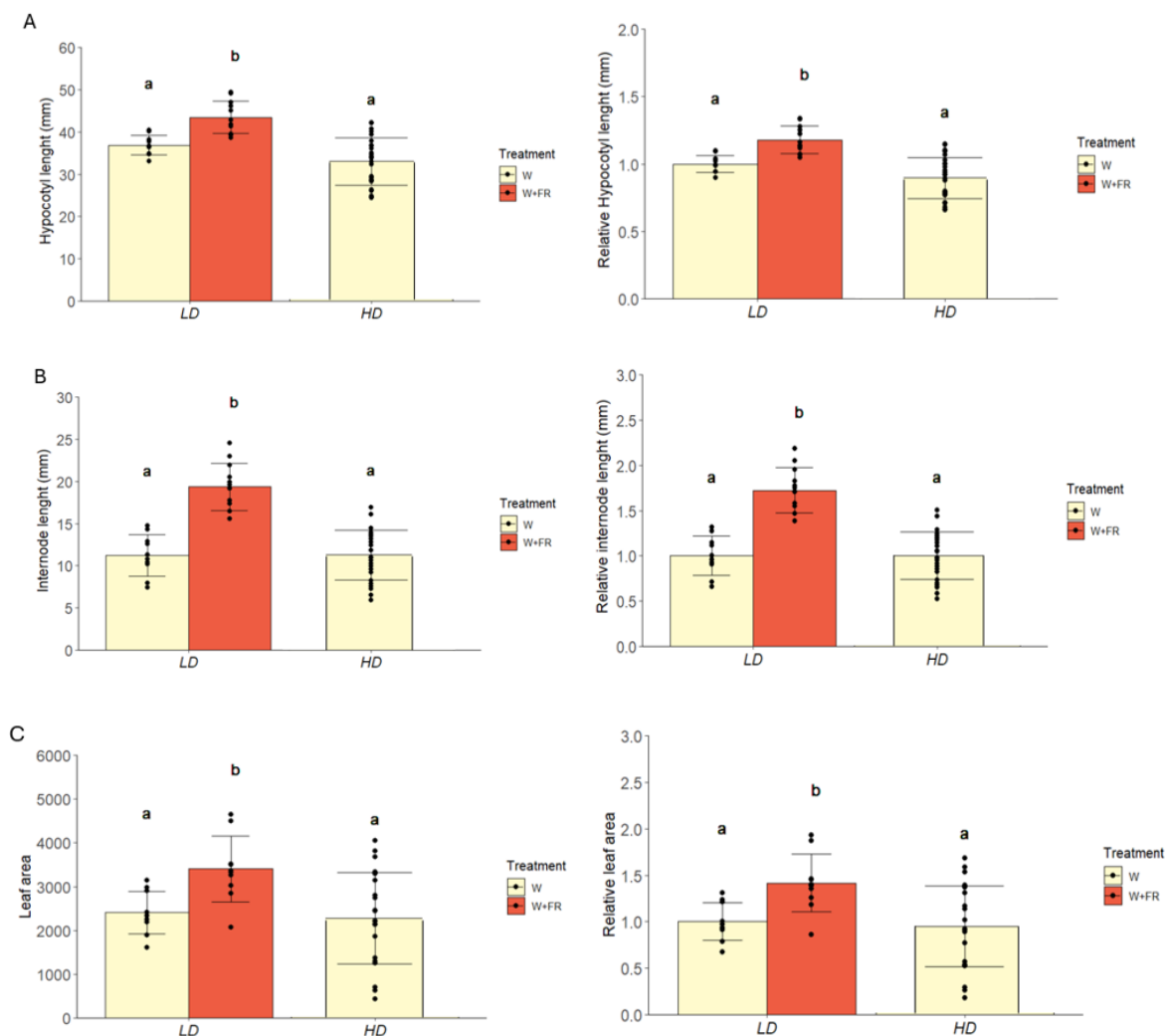


Figura 7. Respuestas a sombra simulada (W+FR vs W) y sombra de proximidad (HD vs LD) en plantas M82. A) Análisis de la longitud del hipocótilo. B) Análisis de la longitud del primer internodo. C) Análisis del área foliar. En los gráficos se muestra el análisis de los absolutos a la izquierda y sus respectivos datos reativizados a la derecha.

Tras el análisis inicial de todas las plantas del experimento, se decidió llevar a cabo un ajuste estadístico de los datos teniendo en cuenta las posibles variaciones causadas por el efecto borde. El efecto borde hace referencia a las diferencias de crecimiento, desarrollo o rendimiento de las plantas situadas en los bordes de un ensayo experimental en comparación con las plantas del interior (Hadjichristodoulou, A. 1993), debido a que estas están sometidas a condiciones ambientales de luz, aireación o espacio diferentes, hecho que genera sesgos en los resultados.

Para evitar este sesgo y asegurar que las conclusiones fueran representativas, se volvió a realizar el análisis previo excluyendo las plantas de los bordes del experimento realizado en condiciones de HD. Dentro de este experimento, además, diferenciamos entre plantas largas (HDg) y cortas (HDp) debido a que bajo condiciones de HD se distinguen estos dos tipos de plantas (Figura Suplementaria 1).

Al comparar los resultados obtenidos de las plantas que han crecido en W y comparando las condiciones de LD y HD, los datos muestran como en HD la elongación del hipocótilo es similar a la elongación en LD (35 mm vs 36 mm) ($P_{\text{valor}}: 0.1$). Sin embargo, la longitud es significativamente menor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) que la de las plantas que crecen bajo W+FR (44 mm), lo que sugiere que un ambiente competitivo puede limitar el crecimiento en altura. Entre las plantas más largas y las más pequeñas (35 mm vs 28 mm) de las crecidas en HD existe una diferencia estadísticamente significativa ($P_{\text{valor}}: 0.001$). Mientras que las plantas más largas, muestran una elongación más pronunciada típica del SAS, las plantas más pequeñas, muestran un crecimiento más reducido debido a la sombra proyectada por las plantas vecinas (Figura Suplementaria 1 y 2A).

En lo que respecta a la elongación del primer internodo, las plantas más largas (HDg) (13 mm) no presentan una diferencia relevante ($P_{\text{valor}}: 0.1$) de las que crecen en LD (11 mm). Mientras que las plantas HDp (7 mm) elongan significativamente menos ($P_{\text{valor}}: 0.001$) que el resto de las plantas. Tal y como se puede observar en la Figura Suplementaria 2B, el tratamiento de sombra simulada produce la elongación más acentuada del análisis. En cuanto al desarrollo del área foliar (Figura Suplementaria 2C), los resultados obtenidos siguen el mismo patrón que los de la elongación del internodo. Con una diferencia significativa ($P_{\text{valor}}: 0.001$) entre las plantas HDp (500 mm²) y el resto de las plantas (HDg: 2600 mm²; LD W: 2500 mm²; LD W+FR: 3400 mm²).

b) Contenido de clorofilas y carotenoides

Por otro lado, se realizaron mediciones del contenido de clorofilas mediante el SPAD y mediante HPLC, el cual también nos otorga información detallada sobre el contenido de carotenoides.

En cuanto al contenido de clorofilas, medido como índice SPAD, se observan diferencias significativas ($P_{\text{valor}}: 0.001$) entre las plantas crecidas en LD bajo las distintas condiciones lumínicas (W o W+FR), ya que se distingue una clara tendencia hacia una menor acumulación de clorofilas en condiciones de sombra simulada en comparación con la acumulación en W (31 vs 37). Por otro lado, al comparar los niveles de clorofilas de las plantas crecidas en W pero en distinta densidad (LD y HD) se ha visto que las plantas crecidas en HD presentan una acumulación de clorofilas significativamente menor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) con respecto a las plantas crecidas en LD (35 vs 37) (Figura 8). Estos resultados sugieren que el tomate M82 muestra respuestas SAS diferenciadas según el tipo de sombra, ya que responde al tratamiento de sombra simulada a nivel de crecimiento y de pigmentos fotosintéticos, pero a la sombra de proximidad real solo responde disminuyendo el nivel de clorofilas en hoja.

Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante HPLC (Figura Suplementaria 3B), en los cuales también se observó una menor acumulación de carotenoides y clorofilas en W+FR respecto a W (Carotenoides: 2.9 vs 3.6; Clorofilas: 2.2 vs 2.7) y no se observaron diferencias significativas entre las plantas crecidas en W pero en distintas densidades ($P_{\text{valor}}: 0.22$). En cuanto al contenido total de tocoferoles no se vieron diferencias significativas ($P_{\text{valor}}: 0.48$) ni entre las distintas densidades ni entre las condiciones lumínicas (Figura Suplementaria 3C). Sin embargo, se distingue una clara tendencia

hacia una menor acumulación de tocoferoles en W+FR en comparación con la acumulación en W (1.2 vs 1.4).

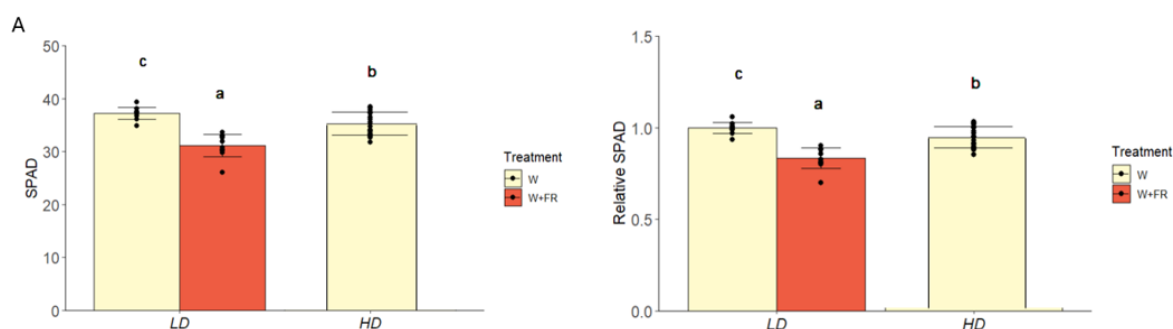


Figura 8. Respuestas a sombra simulada (W+FR vs W) y sombra de proximidad (HD vs LD) en plantas M82. A) Análisis de la acumulación de clorofilas (SPAD). En los gráficos se muestra el análisis de los absolutos a la izquierda y sus respectivos datos reativizados a la derecha.

Teniendo en cuenta el efecto borde, vemos que el contenido de clorofilas (SPAD) presenta la misma tendencia que antes del filtrado de los datos. Se ha observado que en condiciones de sombra simulada hay una menor acumulación de clorofilas ($P_{\text{valor}}: 0.001$) en comparación con la presente en condiciones control de W (32 vs 38). Sin embargo, en condiciones de HD, las plantas presentan la misma respuesta ($P_{\text{valor}}: 0.05$) que las plantas crecidas en LD (Figura Suplementaria 4).

c) Rendimiento fotosintético

El análisis del rendimiento fotosintético de las plantas se llevó a cabo utilizando el equipo LICOR 600, mediante la medición del parámetro de la eficiencia fotosintética efectiva del fotosistema II (PhiPS2). Atendiendo a los datos obtenidos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre W y W+FR ($P_{\text{valor}}: 0.140$), ni entre LD y HD ($P_{\text{valor}}: 0.235$) (Figura 9). A pesar de no encontrar diferencias significativas, se ha observado una ligera tendencia hacia un menor rendimiento fotosintético en las plantas crecidas en W+FR frente a los controles en W y en HD frente a LD (Figura 9), lo que concuerda con la reducción observada en los niveles de clorofilas (Figura 8).

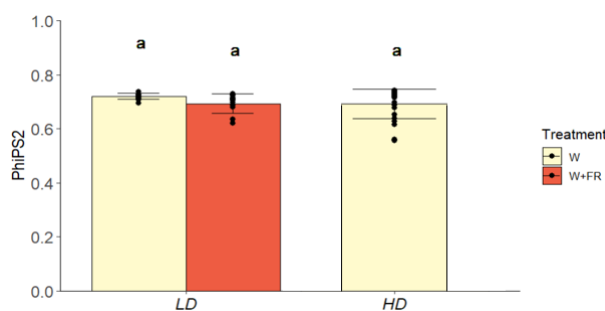


Figura 9. Análisis del rendimiento fotosintético efectivo del PSII (PhiPS2) en condiciones de sombra.

De nuevo, teniendo en cuenta el efecto borde en el análisis del rendimiento fotosintético vemos como este factor no se ve alterado ni por el tratamiento lumínico ni por el tratamiento de las diferentes densidades ($P_{\text{valor}}: 0.235$ y 0.140 respectivamente), ya que la respuesta se mantiene en todos los casos en torno a 0.7 (Figura Suplementaria 5).

2. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE PIF1 EN EL FONDO GENÉTICO MICRO-TOM

La siguiente ronda de experimentos se llevó a cabo utilizando líneas transgénicas de tomate en fondo Microtom (MT) deficientes en PIF1a, PIF1b o ambos, previamente desarrolladas por Miguel Simón Moya durante su tesis doctoral (Simon-Moya et al., 2021). Estas líneas de pérdida de función fueron

generadas mediante la tecnología CRISPR-Cas9, con el objetivo de estudiar las funciones divergentes de los factores de transcripción PIF1a y PIF1b, los cuales mostraron diferencias significativas en su expresión y en su interacción con *phyB*. Mientras que PIF1a conserva la capacidad de interactuar con *phyB*, PIF1b ha perdido esta función, lo que sugiere una diferenciación evolutiva en sus roles biológicos (Simon-Moya et al., 2021).

La caracterización fenotípica inicial de las líneas mutantes demostró que ambos factores de transcripción están implicados en procesos como la regulación de la germinación de las semillas, la síntesis de pigmentos en las hojas y la producción de frutos. Además, se identificaron funciones específicas de PIF1a, relacionadas con el alargamiento de los pelos radiculares. Sin embargo, no se encontró ningún proceso regulado específicamente por PIF1b (Simon-Moya et al., 2021). Por ello, en el presente estudio no se han incluido las líneas deficientes solo en PIF1b, aunque sí las *pif1a* y las dobles mutantes *pif1a/1b* (Figuras 10 a 14).

La caracterización de los mutantes simples de *pif1a* se realizó utilizando dos alelos distintos, los cuales fueron genotipados y secuenciados en este estudio (Figura 10). El alelo *pif1a.1* consta de una inserción de una adenina (A) que produce un cambio en el marco de lectura, que se traduce en la obtención de una proteína truncada no funcional (Figura 11). Este alelo es del que consta el doble mutante de *pif1a/1b*. Por otro lado, el alelo *pif1a.2* presenta una deleción de 12 pares de bases (ACCAAGCTGTCA), lo que se traduce en la pérdida de 4 aminoácidos, pero no en una pérdida del marco de lectura, por lo que esta mutación acaba generando una proteína que consta de todos los dominios funcionales presentes en PIF1a.

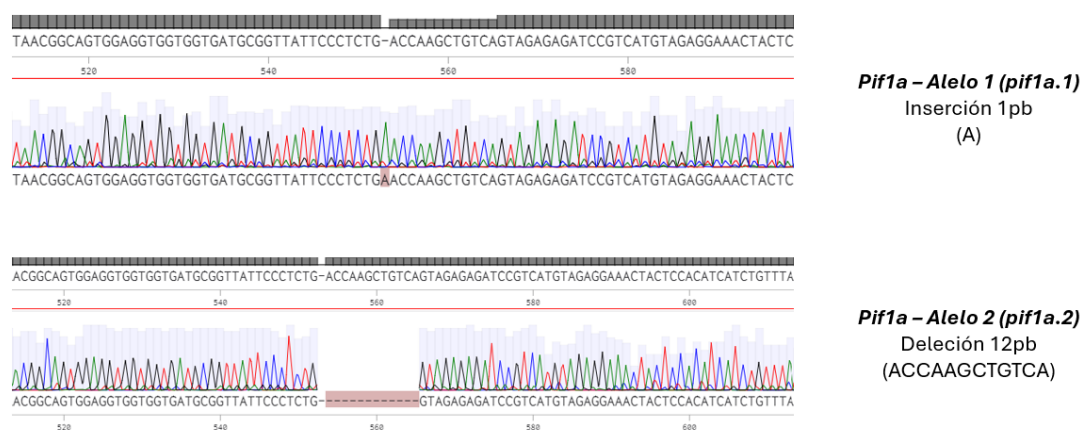


Figura 10. Cromatograma del alelo 1 y 2 de la línea mutante *pif1a*.

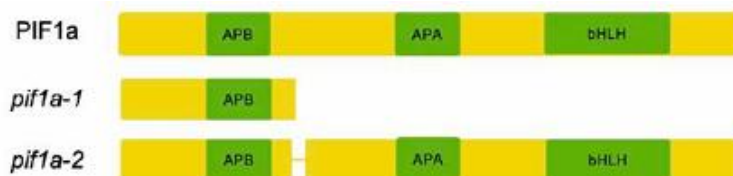


Figura 11. Representación esquemática de la proteína PIF1a en los alelos mutados mediante CRIPR/Cas9. APA, dominio de unión a *phyA*; APB, dominio de unión a *phyB*.

2.1 Confirmación de la pérdida de función de PIF1a en el alelo *pif1a.2*

Uno de los fenotipos más distintivos de las líneas de tomate deficientes en PIF1a es el desarrollo de pelos radiculares (Simon-Moya et al., 2021). Tanto las plantas no mutadas como el mutante *pif1b* presentaban pelos radiculares, mientras que en las raíces de *pif1a.1* y del doble mutante *pif1a/1b* tan solo se observaban los primordios de los pelos radiculares (Simon-Moya et al., 2021).

En base a esta información, se repitió este experimento utilizando el segundo alelo del mutante *pif1a*, *pif1a.2*, el cual no fue testado en la tesis anteriormente mencionada. Se esperaba que si el alelo *pif1a.2* generaba una pérdida de función se observaría un fenotipo de ausencia de pelos radiculares similar al del alelo *pif1a.1*.

Mediante el Macroscopio Leica DMS 1000 se visualizaron y capturaron imágenes de las raíces de las plántulas una semana después de su germinación. Mientras que las plántulas silvestres y *pif1b* presentaban pelos radiculares, los mutantes *pif1a*, tanto *pif1a.1* como *pif1a.2* y el doble mutante *pif1a/1b*, no presentaron pelos radiculares (Figura 12), hecho que confirma la replicabilidad del experimento e indica que el alelo *pif1a.2* es de pérdida de función.

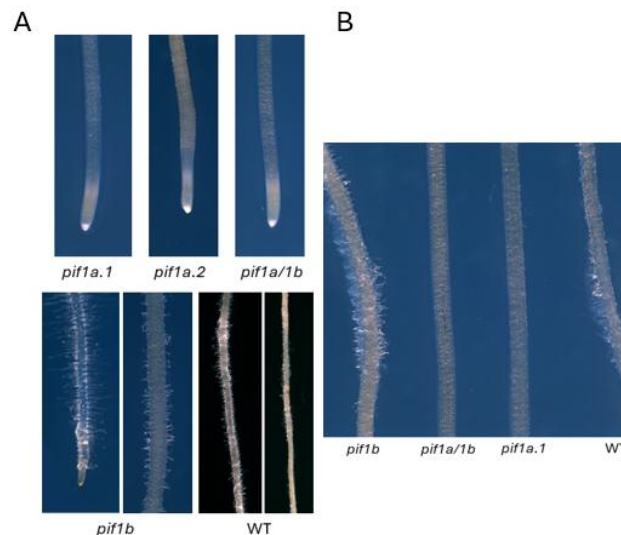


Figura 12. A y B) Fenotipo visual de los pelos radiculares del WT y de las plántulas mutantes de PIF1.

2.2 Caracterización de la respuesta a sombra de proximidad

a) Respuestas de crecimiento

Para caracterizar las respuestas de crecimiento de plántulas silvestres y deficientes en PIF1 se evaluaron parámetros fisiológicos clave, como la elongación del hipocótilo, la del primer internodo y el desarrollo del área foliar; bajo W y W+FR. Estos análisis se realizaron con el fin de analizar como responden los diferentes genotipos al tratamiento de sombra simulada (W+FR) y determinar si muestran algún grado de tolerancia (Figura 13).

Respecto a la elongación del hipocótilo, no existen diferencias significativas ($P_{\text{valor}}: 0.741$) ni entre W y W+FR ni entre los diferentes genotipos. Sin embargo, las plántulas silvestres (MT) tienden a presentar una mayor elongación del hipocótilo en W+FR con respecto a W (22 mm vs 19 mm). Esto se debe a que la planta cuando percibe un menor R:FR, activa el SAS, lo que hace que la planta elongue. Por otro lado, *pif1a.2* también presenta una mayor elongación en W+FR, aunque muy tenue, siendo este cambio imperceptible en *pif1a.1* y en el doble mutante *pif1a/1b* (Figura 14A). Estos datos sugieren que la mutación individual de estos genes apenas tiene un efecto diferencial en la elongación del hipocótilo comparado con las plantas no editadas de Microtom (MT).

En el análisis de elongación del primer internodo, tampoco se han visto diferencias significativas en ninguno de los casos ($P_{\text{valor}}: 0.373$) pero se confirman las tendencias observadas con el alargamiento del hipocótilo (más evidentes al comparar los datos relativos a los valores en W para todos los genotipos). El control (MT) muestra una tendencia hacia un mayor alargamiento del internodo en W+FR en comparación con W (12 mm vs 7.5 mm), lo que indica una respuesta típica de SAS. Este hecho también

sucede en los mutantes simples *pif1a.2*, pero se atenúa en *pif1a.1* y en el doble mutante *pif1a/1b*, siendo este último el que presenta una respuesta más atenuada a la sombra simulada (7 mm) (Figura 14B).

Respecto al área foliar (Figura 14C), los datos muestran cómo no existen diferencias significativas ni entre W y W+FR, ni entre los genotipos en ninguno de los casos ($P_{\text{valor}}: 0.702$). En cuanto a tendencias, se ha visto un aumento del área foliar en W+FR respecto a W en MT, *pif1a.1* y en el doble mutante *pif1a/1b* que se atenúa en el mutante simple *pif1a.2*. Estos resultados sugieren que los alelos *pif1a.1* y *pif1a.2* no serían funcionalmente idénticos en cuanto a la respuesta a sombra en estadios tempranos de desarrollo de la planta de tomate. Mientras que la mutación *pif1a.1* atenúa las respuestas de elongación, la mutación *pif1a.2* parece afectar a la expansión foliar (Figura 13).

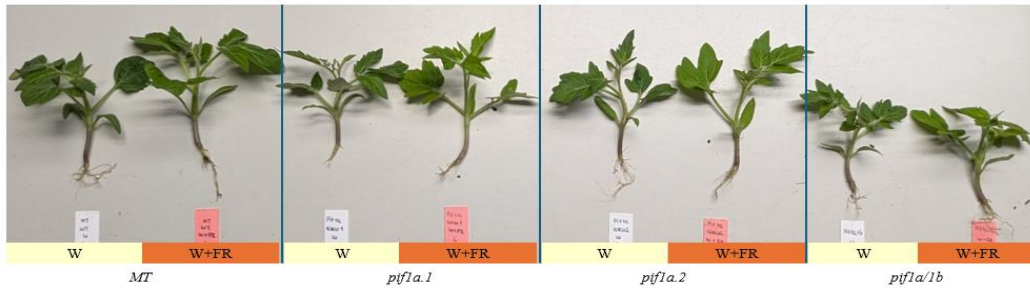


Figura 13. Caracterización del crecimiento de la planta silvestre MT y los mutantes PIF1.

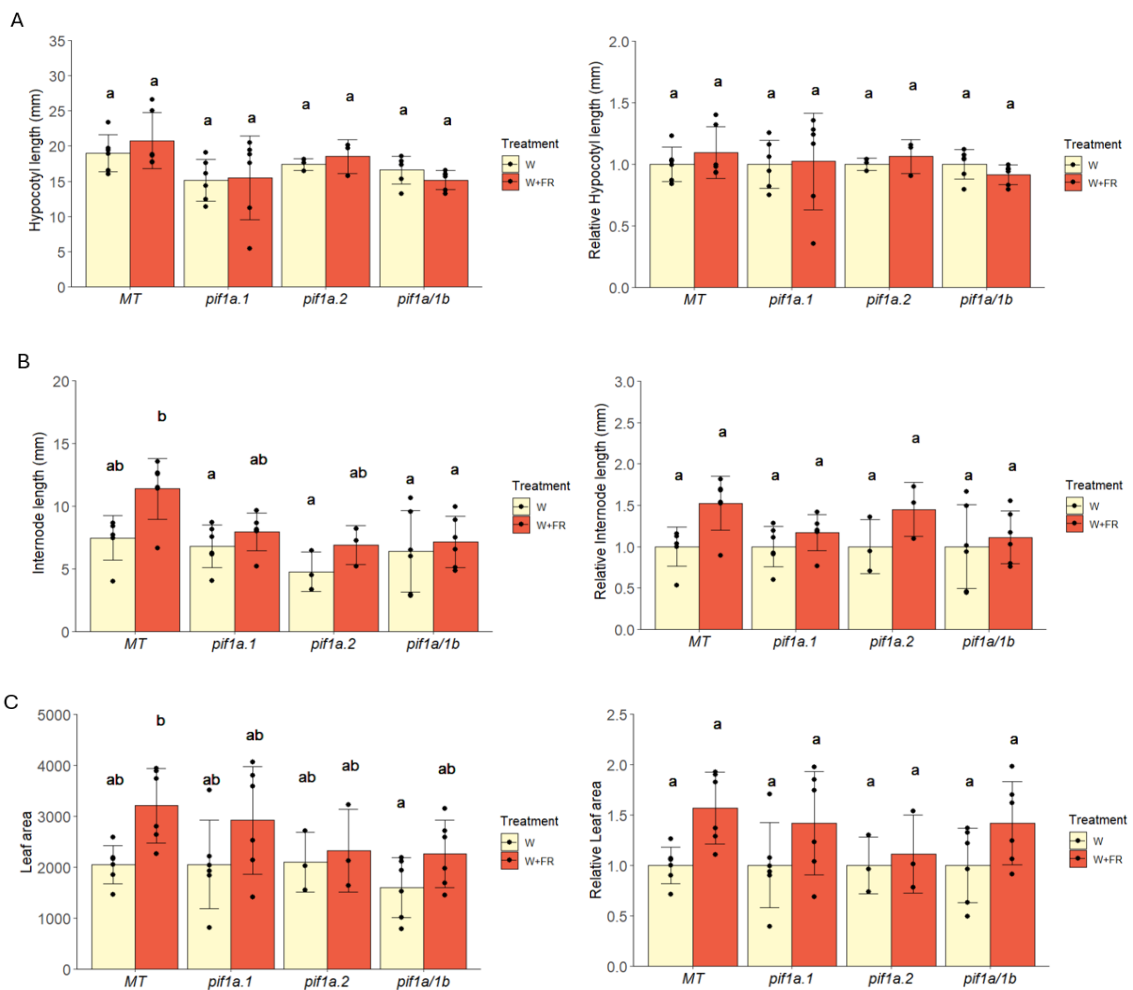


Figura 14. A) Análisis de la longitud del hipocótilo. B) Análisis de la longitud del primer internodo. C) Análisis del área foliar. En los gráficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

b) Contenido de clorofilas y carotenoides

El contenido de clorofilas, que fue tomado mediante mediciones con el SPAD, mostró que las plantas silvestres de MT presentan una acumulación similar en W y en W+FR (39.5 vs 39), hecho no esperado ya que una de las respuestas características del SAS es la disminución significativa de la clorofila bajo condiciones de sombra. Este esperado descenso en W+FR, se da sin embargo de forma significativa ($P_{\text{valor}}: 0.001$) en los alelos mutados *pif1a.1* y *pif1a.2* y en *pif1a/1b* (Figura 15).

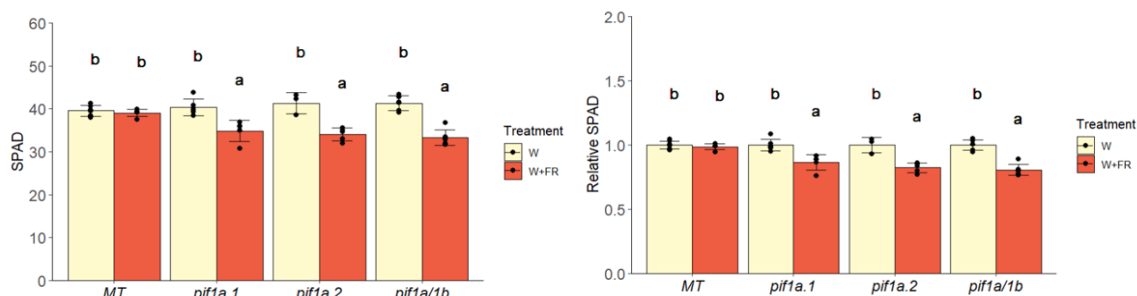


Figura 15. Análisis de la acumulación de clorofilas (SPAD) del control y las líneas mutantes de PIF1.

Por otro lado, en cuanto al contenido total de clorofilas y carotenoides obtenidos mediante HPLC, los datos mostraron que no existen diferencias significativas ni entre los distintos genotipos ($P_{\text{valor}}: 0.846$) ni entre los tratamientos de W y W+FR ($P_{\text{valor}}: 0.131$). En cualquier caso, los datos relativos muestran una tendencia a la disminución en los niveles de clorofilas y carotenoides en W+FR para todos los genotipos excepto para el alelo *pif1a.2*, aunque probablemente sea debido a la gran dispersión de datos (Figura Suplementaria 6 A-B).

En cuanto al contenido de tocoferoles (Figura Suplementaria 6C), aunque las diferencias no sean significativas ni entre los genotipos ni entre los diferentes tratamientos ($P_{\text{valor}}: 0.534$), el WT mostró una clara tendencia a una menor acumulación de tocoferoles bajo W+FR, pero no ocurre lo mismo en el resto de los mutantes.

c) Rendimiento fotosintético

Respecto al rendimiento fotosintético efectivo del fotosistema II (PhiPS2), los datos mostraron que este parámetro no se ve afectado por las condiciones lumínicas (W o W+FR), ni por la pérdida de función de PIF1, ya que todos los genotipos responden igual que el control y no existen diferencias significativas ($P_{\text{valor}}: 0.224$) (Figura 16).

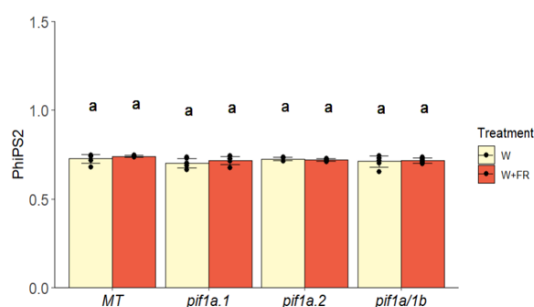


Figura 16. Análisis del rendimiento fotosintético efectivo del PSII (PhiPS2) en condiciones de sombra.

3. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE PIF7 EN EL FONDO GENÉTICO MICRO-TOM

3.1 Generación de líneas de pérdida de función de PIF7

El genoma de tomate contiene dos genes codificantes para homólogos de PIF7, denominados PIF7a y PIF7b. El trabajo llevado a cabo en el laboratorio por Esteban Burbano Erazo permitió conseguir

transgénicas CRISPR-Cas9 de tomate en Microtom con ediciones en uno o ambos genes, pero no se llegaron a aislar líneas monoalélicas homocigotas. Antes de llevar a cabo la caracterización de la respuesta a sombra de mutantes deficientes en PIF7 fue por tanto necesario realizar una selección de las líneas homocigotas en la generación T3 mediante el genotipado y la secuenciación de los individuos de esta generación. De entre todos los individuos homocigotos, únicamente se seleccionaron aquellos que eran Cas9 negativos.

Se seleccionaron las líneas *pif7a/7b-3.8*, *pif7a/7b-3.14* y *pif7a/7b-4.25*, a partir de ahora nombradas como P3.8, P3.14 y P4.25, respectivamente. Estas líneas mostraban mutaciones tanto en *PIF7a* como en *PIF7b*. Los individuos P3.8 y P3.14 provienen de la misma madre (P3) y ambos constan de la misma mutación en *PIF7b*, una deleción de 2pb (TG) que provoca un cambio en el marco de lectura y por tanto la pérdida de función de este gen (Figura 17). En cuanto a *PIF7a*, los individuos P3.8 presentan una deleción de 11pb (TGAACAGCTGC) y los individuos P3.14 presentan una deleción de 7pb (AGCTGCT), traduciéndose ambas en una pérdida del marco de lectura y en la obtención de una proteína no funcional (Figura 18). En cuanto al individuo P4.25, este proviene de otra madre distinta a los otros dos mutantes y en consecuencia también consta de mutaciones diferentes en ambos genes; presentando una deleción de 1 base (C) en *PIF7a* y una deleción de 64 pb junto con un SNP (G>A) en *PIF7b* lo que se traduce en ambos casos en una pérdida del marco de lectura (Figura 18).

Los experimentos de caracterización de estas líneas se hicieron de la misma forma que en los apartados anteriores. En este caso, se utilizó como control la planta silvestre de la variedad Micro-Tom, dado que los mutantes fueron generados en este fondo genético.

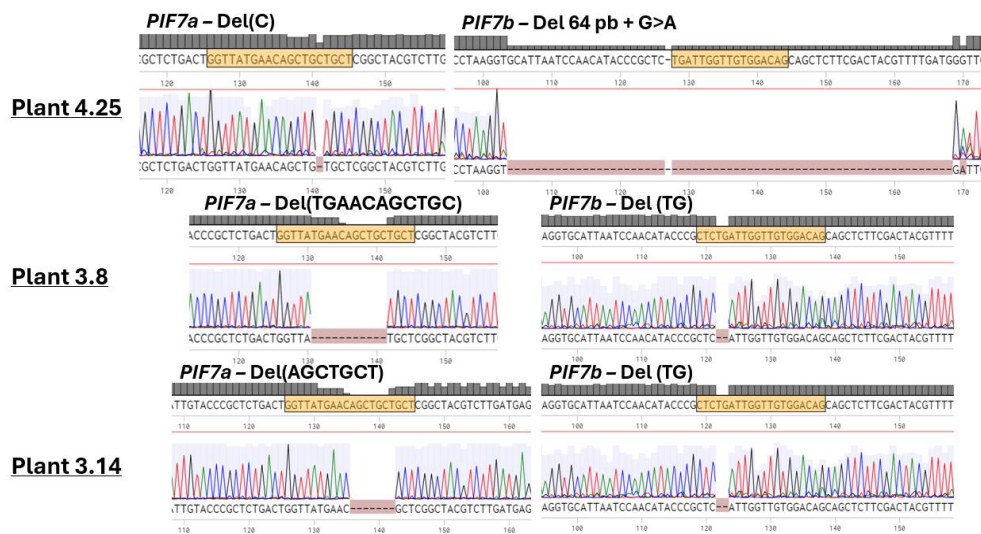


Figura 17. Cromatogramas de las líneas P4.25, P3.8 y P3.14 con mutaciones en los factores *PIF7a* y *PIF7b*.

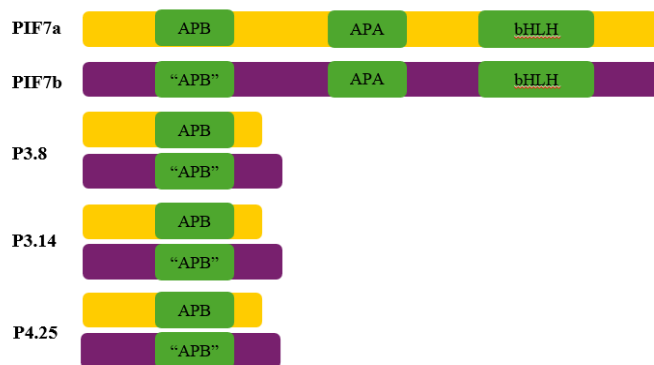


Figura 18. Representación esquemática de las proteínas *PIF7a* y *PIF7b* en los alelos mutados mediante CRISPR/Cas9. APA, dominio de unión a phyA; APB, dominio de unión a phyB.

3.2 Caracterización de la respuesta a sombra de proximidad

a) Respuestas de crecimiento

Una vez aplicado el tratamiento lumínico (W o W+FR) se llevó a cabo el análisis de elongación del hipocótilo, el primer internodo y el área foliar de los diferentes genotipos (Figura 19 y 20).

En primer lugar, se midió la elongación del hipocótilo (Figura 20A). Los datos analizados muestran como las plantas MT no editadas presentan una elongación del hipocótilo significativamente mayor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) en W+FR en comparación con la elongación en W (24 mm vs 18.5 mm). Las líneas P3.8 y P3.14 presentan un comportamiento similar al del WT, mostrando un crecimiento significativamente mayor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) en W+FR respecto a W (20 mm vs 14 mm). En el caso del mutante P4.25, no se observan diferencias significativas ($P_{\text{valor}}: 0.014$) en la longitud del hipocótilo entre los tratamientos lumínicos. Estos datos indican que esta línea presenta una respuesta atenuada a la sombra simulada (W+FR) en cuanto a alargamiento del hipocotilo, lo que la hace más tolerante a esta condición (Figura 19).

En el análisis de la elongación del primer internodo se vió que MT presenta una clara tendencia a una mayor elongación en W+FR con respecto a W (12 mm vs 7mm). En cuanto a las líneas mutantes, todas presentan una mayor elongación del primer internodo en W+FR, pero esta solo es significativa en P3.14 ($P_{\text{valor}}: 0.001$) (Figura 20B).

Finalmente, respecto al análisis del área foliar, en MT no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos lumínicos ($P_{\text{valor}}: 0.0732$), aunque se repite una clara tendencia a una mayor área foliar en W+FR con respecto a W (2400 mm² vs 1900 mm²). En cuanto a los mutantes, todos presentan una mayor área foliar en W+FR respecto a W, pero las diferencias son únicamente significativas en las líneas P3.8 y P3.14 ($P_{\text{valor}}: 0.001$) (Figura 20C).

Es importante destacar que las líneas mutantes presentan un tamaño absoluto menor en comparación con la línea silvestre (MT). Esta reducción en el tamaño se atribuye a las mutaciones en los genes PIF7a y PIF7b (Figura 19).

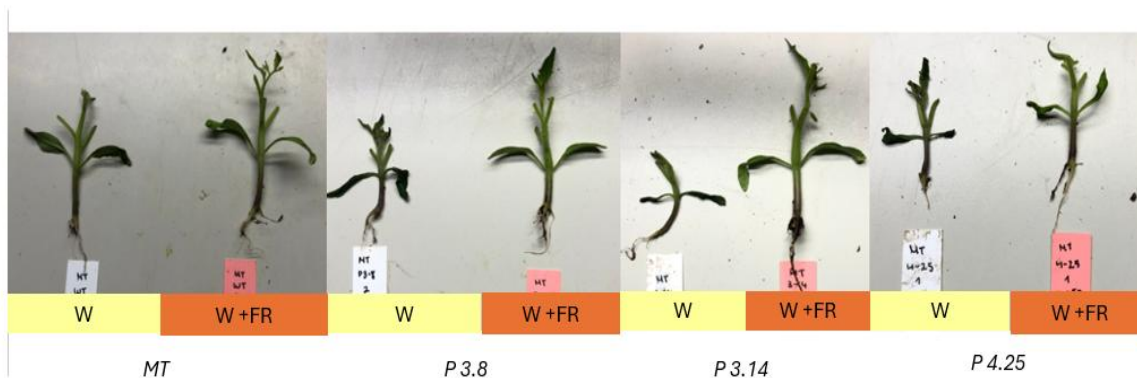


Figura 19. Fenotipo visual del control y las líneas mutantes pif7a/7b en condiciones de W y W+FR.

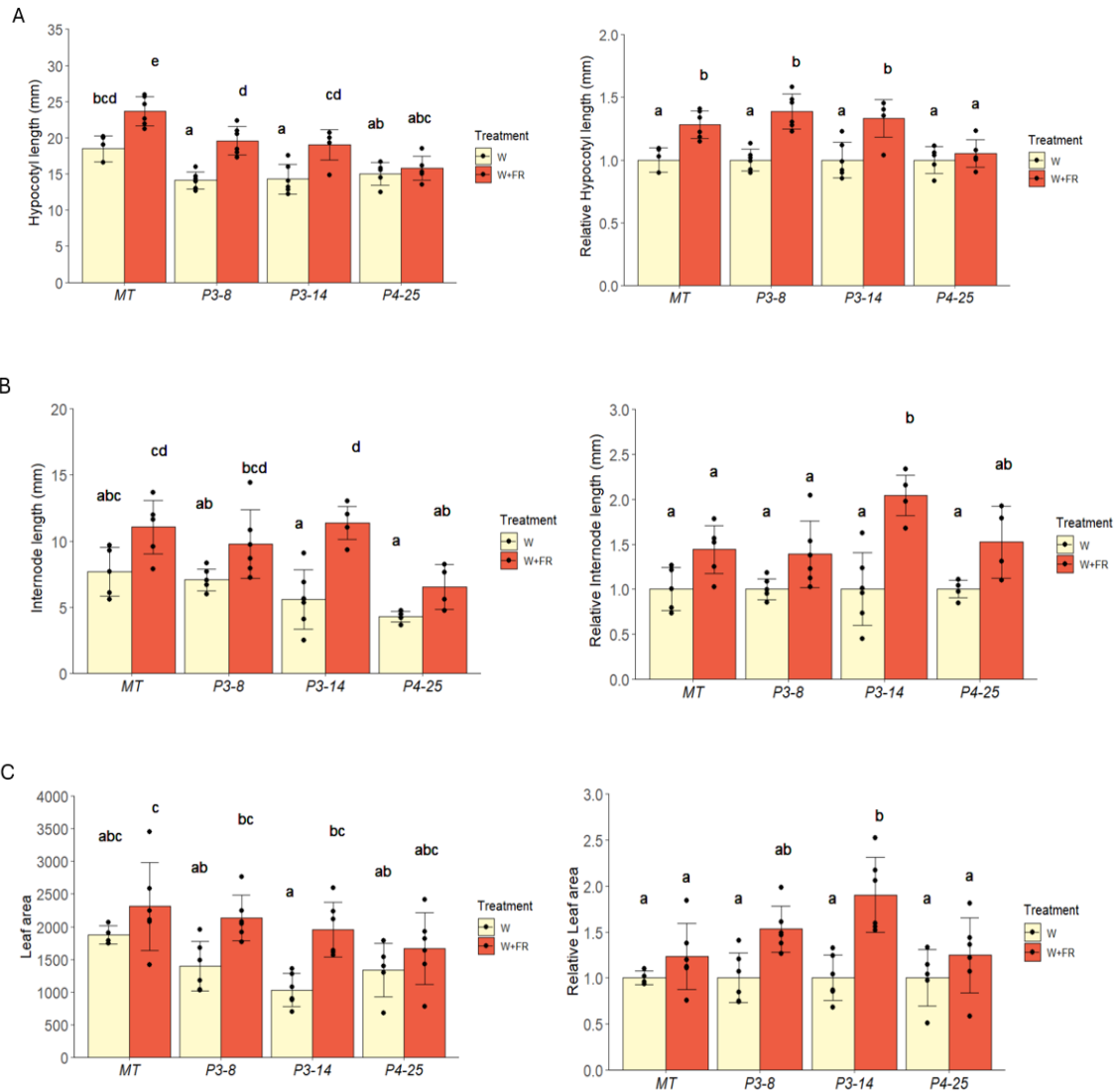


Figura 20. Respuestas a sombra simulada (W+FR vs W) en plantas con fondo genético Micro-Tom y mutantes *pif7a/7b*. A) Análisis de la longitud del hipocotilo. B) Análisis de la longitud del primer internodo. C) Análisis del área foliar. En los graficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

b) Contenido de clorofilas y carotenoides

En el análisis de la acumulación de clorofilas realizado con el SPAD se vio como bajo el tratamiento de sombra simulada (W+FR vs W) el contenido de este pigmento fotosintético era significativamente menor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) tanto en MT como en las líneas mutantes (38 vs 40) (Figura 21).

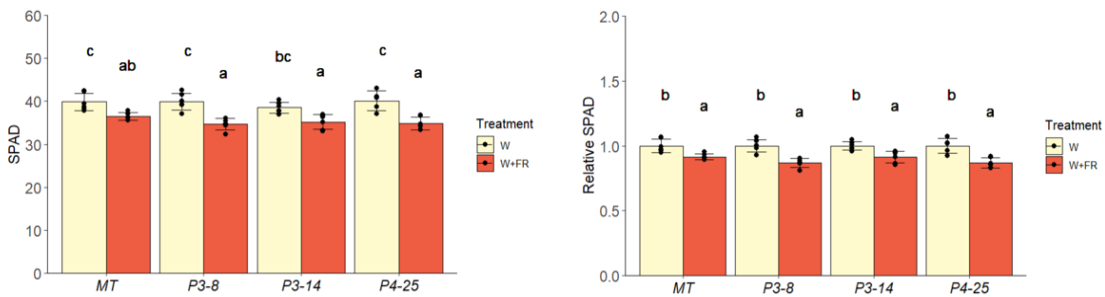


Figura 21. Análisis de la acumulación de clorofilas (SPAD) del control y las líneas mutantes *pif7a/7b*. En los graficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

Con estas mismas muestras se cuantificó el contenido de clorofilas y carotenoides mediante HPLC (Figura 22A y B). Mediante este análisis se observó un descenso tanto en el contenido de clorofilas como en el de carotenoides en condiciones de sombra simulada en el WT y en las líneas mutantes P3.8 y P3.14; aunque estas diferencias solo eran significativas en el contenido de carotenoides ($P_{\text{valor}}: 0.001$). Por otro lado, la línea P4.25 presenta unos niveles similares de los diferentes pigmentos en condiciones de W y W+FR, siendo ligeramente superiores los niveles de tocoferoles en condiciones de sombra simulada (Figura 22C).

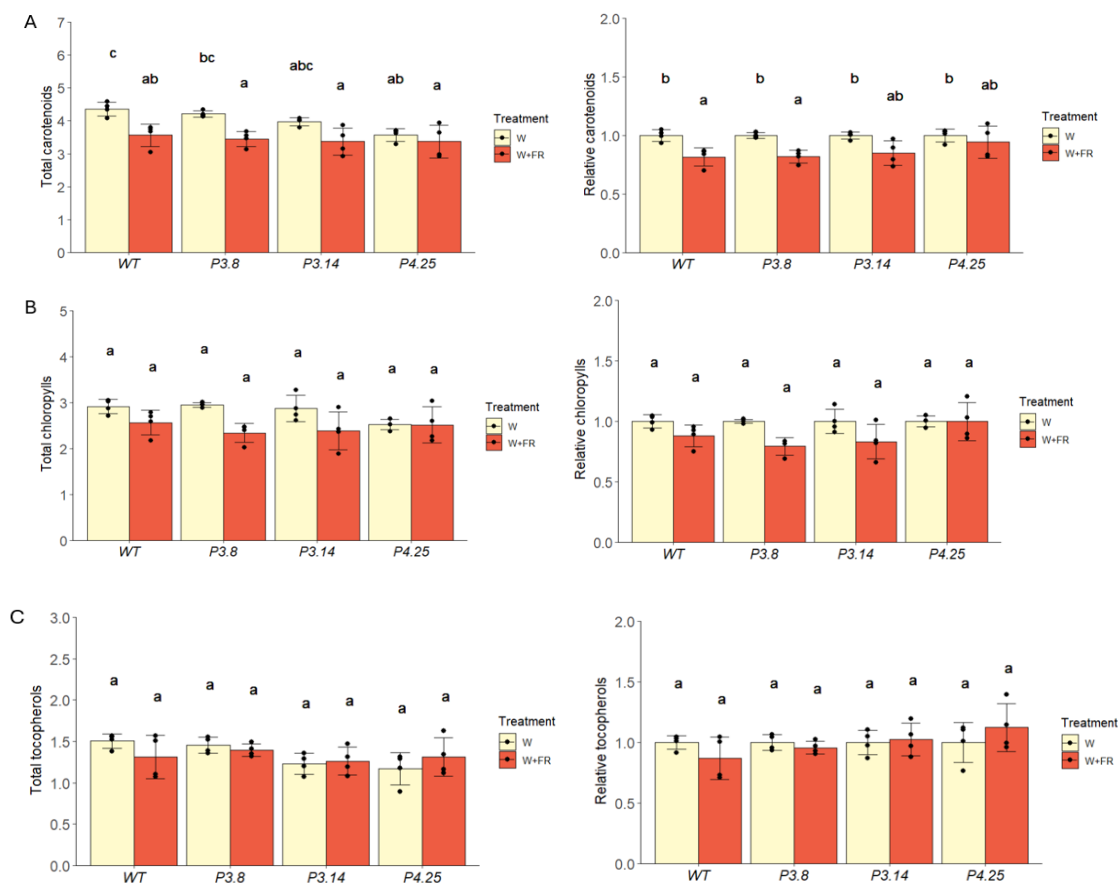


Figura 22. A) Contenido total de carotenoides del WT y los mutantes de PIF7. B) Contenido total de clorofilas del WT y los mutantes de PIF7. C) Contenido total de tocoferoles del WT y los mutantes de PIF7. En los gráficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

c) Rendimiento fotosintético

Por último, respecto al análisis del rendimiento fotosintético de las plantas, no se observaron diferencias significativas ($P_{\text{valor}}: 0.877$) entre los tratamientos de W y W+FR en ninguno de los genotipos (Figura 23).

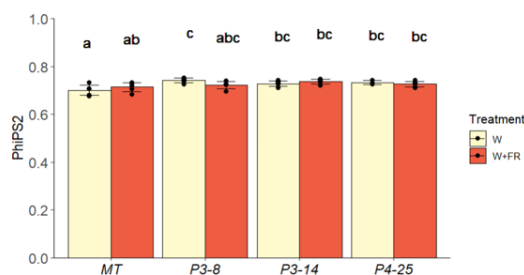


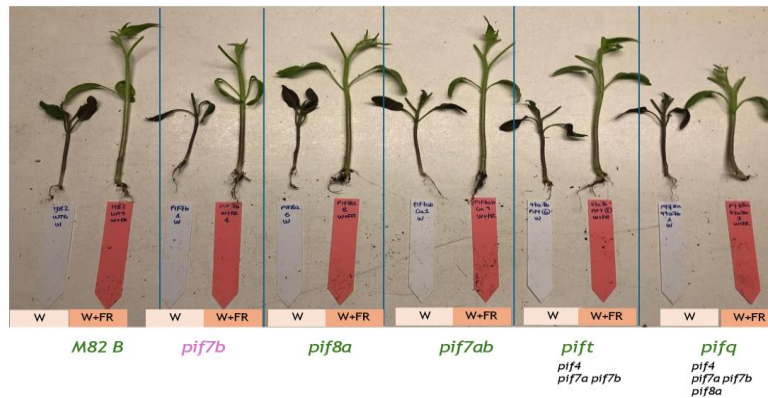
Figura 23. Análisis del rendimiento fotosintético efectivo del PSII (Φ_{PS2}) en condiciones de sombra.

4. EXPERIMENTO DE LINEAS MUTANTES PIF EN FONDO GENÉTICO M82

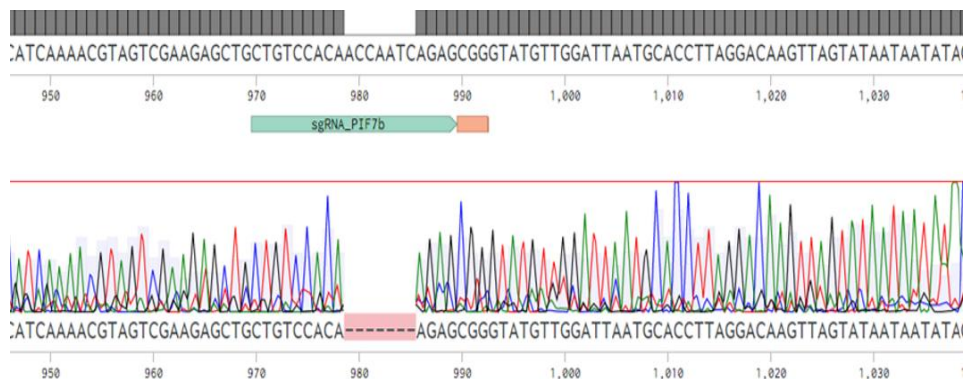
Los experimentos realizados hasta este punto con plantas de tomate Microtom (MT) mostraron que este fondo genético muestra una respuesta a sombra bastante débil, lo que dificulta detectar fenotipos de tolerancia en los mutantes ensayados. La ronda inicial de nuestros experimentos mostró que la respuesta a sombra de plantas M82 era mucho más clara (Figuras 7-8). Por tanto, se decidió contactar con el investigador Yogev Burko (ARO Volcani Center, Israel), que había generado varios mutantes deficientes en PIFs por CRISPR-Cas9 en fondo M82, para colaborar en la caracterización de la respuesta a sombra de proximidad de estas líneas.

Además de las cuatro líneas cedidas por el colaborador Yogev Burko (*pif8a*, *pif7a/7b*, *pif4/7a/7b* o *pift* y *pif4/7a/7b/8a* o *pifq*), también incluimos en el análisis una línea mutante *pif7b* en fondo M82 que fue generada en nuestro laboratorio por Esteban Burbano utilizando la tecnología CRISPR-Cas9 (Figura 24 A). Esta línea mutante *pif7b* muestra una deleción de 7 pb (ACCAATC) que generan una pérdida del marco de lectura (Figura 24B y C).

A



B



C



Figura 24. A) Fenotipado del control (M82) y las líneas mutantes en condiciones de W y sombra simulada (W+FR). B) Cromatograma del alelo mutante de *pif7b* en el fondo genético M82. C) Representación esquemática de la proteína PIF7b en el alelo mutado mediante CRISPR/Cas9. APA, dominio de unión a *phyA*; APB, dominio de unión a *phyB*.

a) Respuesta de crecimiento

Al igual que en los ensayos previos, en primer lugar, se realizó un análisis de la elongación del hipocótilo, el primer internodo y el área foliar tras el tratamiento lumínico (3 días en W + 11 días en W o W+FR).

La línea control M82 mostró una mayor elongación del hipocótilo en W+FR en comparación con las plantas crecidas en W (70 mm vs 45 mm). Este patrón se repite en todos los genotipos analizados (Figura 26A), aunque la magnitud de la respuesta disminuye progresivamente a medida que aumenta el número de genes mutados de la familia PIF. En particular, la significancia estadística se pierde en el mutante *pif4/7a/7b/8a*, que presenta una respuesta muy atenuada al tratamiento de W+FR, con una elongación en estas condiciones prácticamente equivalente a la registrada en W (55 mm vs 48 mm). Estos resultados sugieren que el mutante *pif4/7a/7b/8a* tiene una elevada tolerancia a la sombra simulada.

En cuanto a la elongación del primer internodo (Figura 26B), el WT presenta una elongación significativamente mayor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) en W+FR en comparación con su crecimiento en W (33 mm vs 13 mm). Este comportamiento también se observa en las líneas mutantes, aunque la tendencia se atenúa conforme aumenta el número de genes mutados de la familia de los PIFs. De nuevo, el mutante *pif4/7a/7b/8a* destaca por presentar una elongación en sombra simulada (W+FR) significativamente menor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) que la del resto de los genotipos analizados. Estos resultados confirman que el cuádruple mutante tiene una mayor tolerancia a la sombra simulada que el resto de las líneas mutantes.

Otro de los parámetros analizados fue el área foliar en (W vs W+FR) (Figura 26C). En este caso, el WT mostró un aumento significativo ($P_{\text{valor}}: 0.001$) del área foliar bajo W+FR. A pesar de que la magnitud de la respuesta va variando en los diferentes genotipos, esta tendencia se repite. Sin embargo, el cuádruple mutante *pif4/7a/7b/8a* presentó la respuesta del área foliar relativa más baja. Este dato constata la mayor tolerancia de esta línea a condiciones de sombra simulada.



Figura 25. Fenotipo visual del control (M82) y *pif4/7a/7b/8a* en W y W+FR.

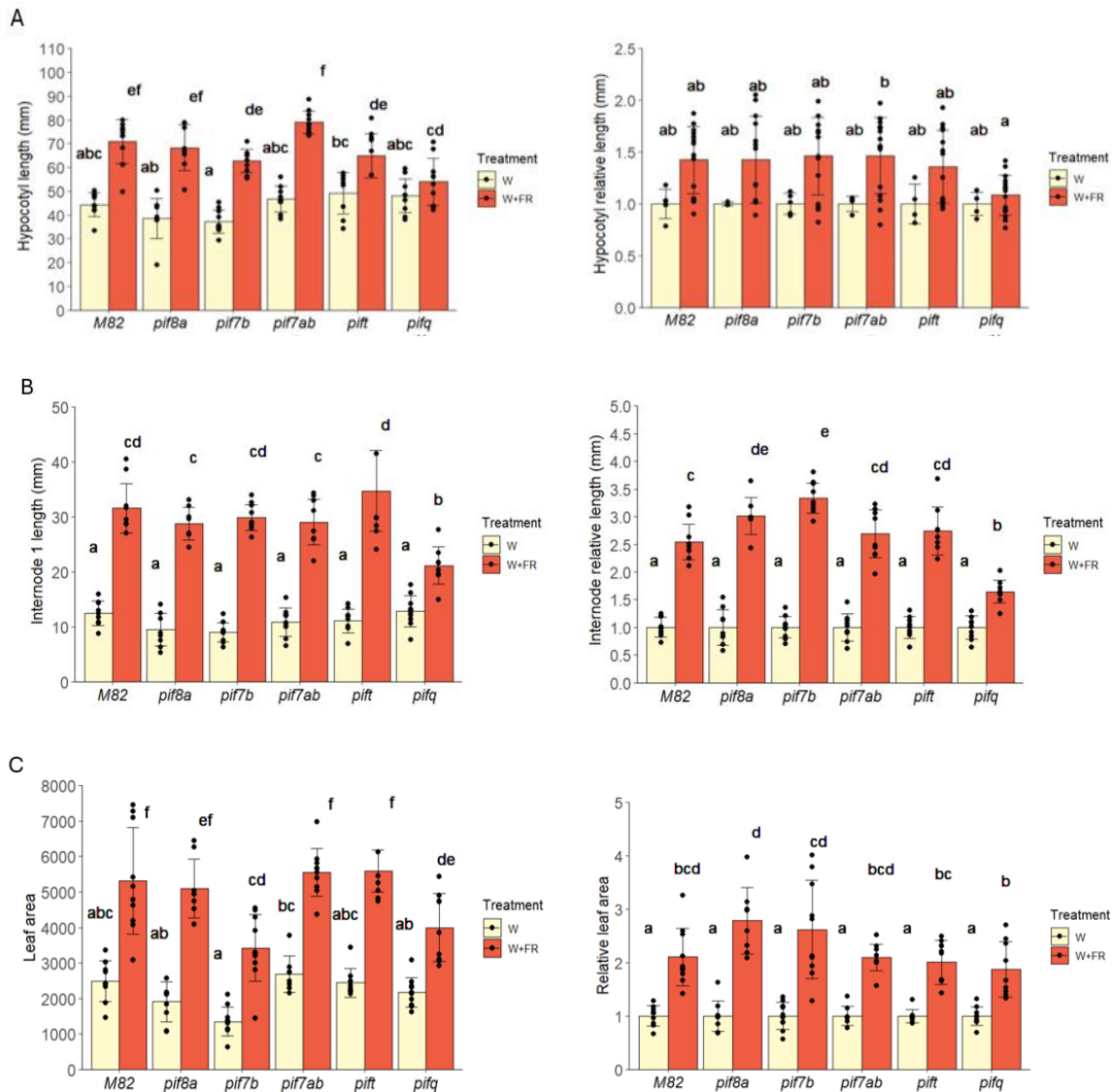


Figura 26. Respuestas a sombra simulada (W+FR vs W). A) Análisis de longitud del hipocótilo. B) Análisis de longitud del primer internodo. C) Análisis del área foliar. En los graficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

Este primer ensayo ha permitido concluir que *pif4/7a/7b/8a* es la única de las líneas analizadas claramente tolerante a sombra simulada (Figura 25) y por tanto que el efecto aditivo de estos genes tiene un gran peso en la obtención de un fenotipo.

En estudios previos realizados por Esteban Burbano se constató que los mutantes de *pif7b* en fondo M82 presentaban cierta tolerancia a sombra simulada, hecho que no vimos en el experimento actual. Para verificar los resultados, se diseñó un nuevo experimento en el que se comparó esta línea *pif7b* con el M82 de nuestro laboratorio utilizado para generarla (denominado M82E) y se incluyó el mutante *pifq* (*pif4/7a/7b/8a*) junto con el M82 que se usó para generarla (M82B) De esta forma pudimos hacer la comparativa entre ambas líneas supuestamente tolerantes a sombra con sus controles reales.

En este nuevo experimento pudimos evidenciar que el control del laboratorio, denominado M82E, consta de un tamaño un poco más reducido que el control de Y. Burko, denominado M82B, aunque las diferencias no son significativas. A pesar de las diferencias, ambos controles presentan una elongación significativamente mayor ($P_{\text{valor}}: 0.001$) en W+FR respecto a W. Hecho que también sucede en el mutante *pif7b*. Mientras que, de nuevo, el cuádruple mutante no presenta diferencias significativas entre ambas

condiciones lumínicas lo que valida de nuevo la tolerancia a sombra simulada de esta línea (Figura 27 A y 28).

Resultados similares se obtuvieron en los ensayos de la elongación del primer internodo y del área foliar, presentando en ambos casos *pif7b* una clara respuesta a las condiciones de sombra simulada (W+FR). Sin embargo, en *pif4/7a/7b/8a* esta respuesta está mucho más atenuada, lo que se traduce en una mayor tolerancia a W+FR de esta línea (Figura 27B y C).

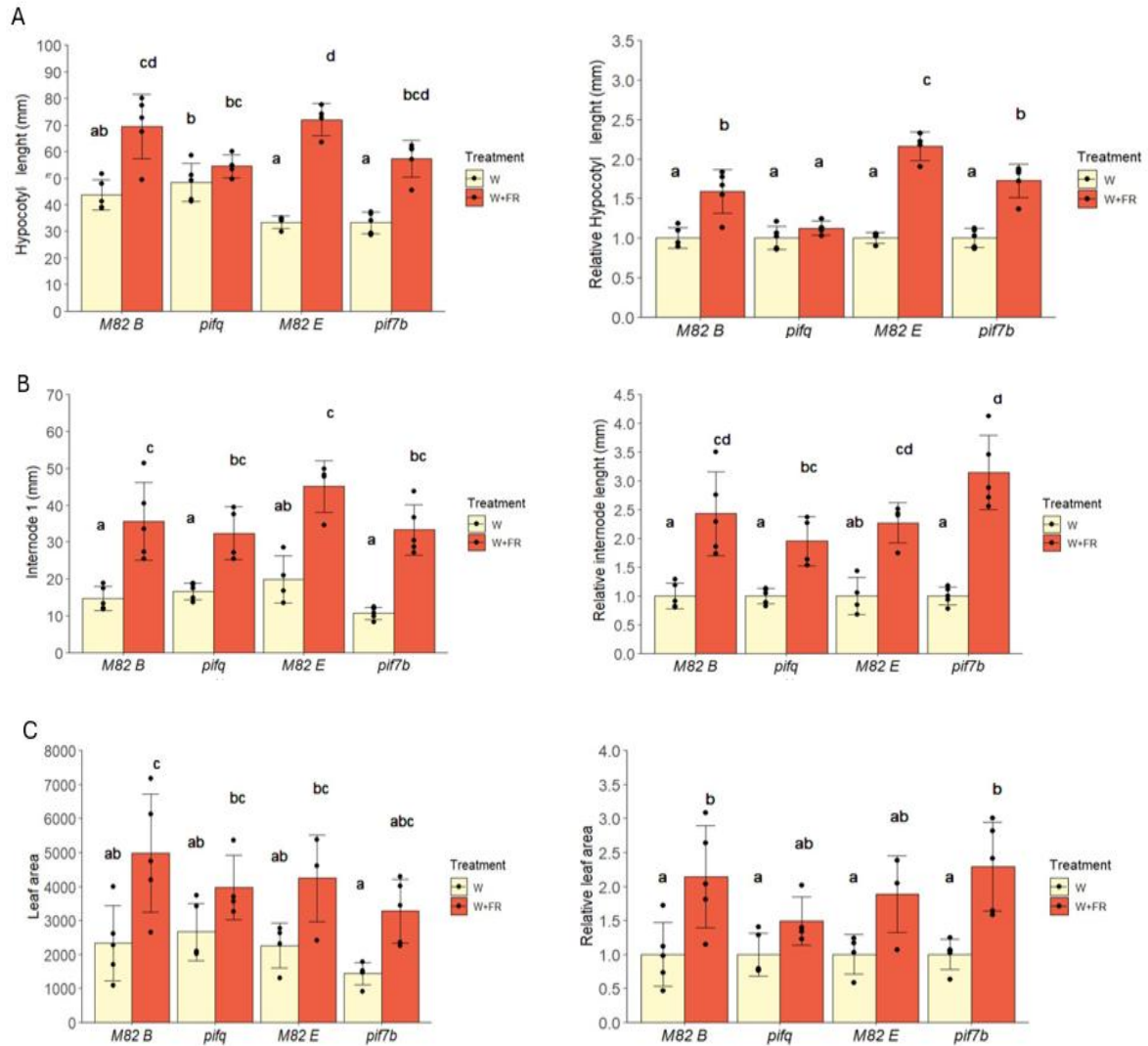


Figura 27. Respuestas a sombra simulada (W+FR vs W). A) Análisis de longitud del hipocótilo. B) Análisis de longitud del primer internodo. C) Análisis del área foliar. En los gráficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

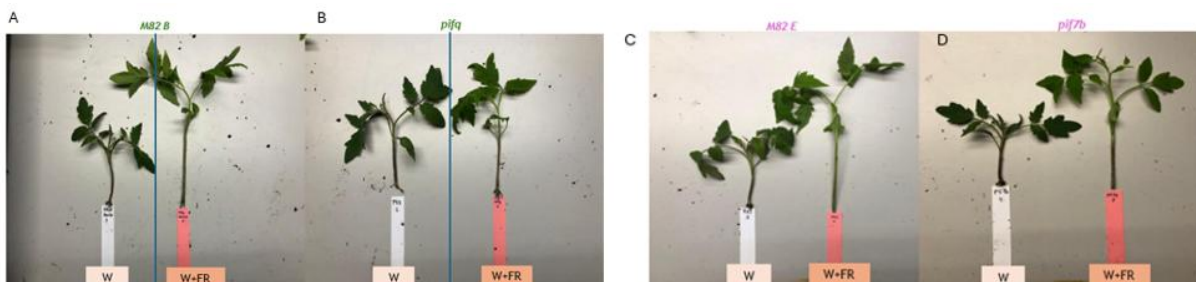


Figura 28. A) Fenotipo visual del genotipo control M82 B bajo W y W+FR. B) Fenotipo visual de *pif4/7a/7b/8a* bajo W y W+FR. C) Fenotipo visual del genotipo control M82 E bajo W y W+FR. D) Fenotipo visual de *pif7b* bajo W y W+FR.

b) Contenido de clorofilas y carotenoides

Todos los genotipos analizados en el presente estudio responden al tratamiento de sombra simulada (W+FR) con un descenso significativo en el contenido de clorofilas (Figura 29A) ($P_{\text{valor}}: 0.001$). Hecho que también se ve claramente en el segundo ensayo realizado únicamente con los controles (M82B y M82E) y los mutantes *pif7b* y *pif4/7a/7b/8a* (Figura 29B) ($P_{\text{valor}}: 0.001$). Con las muestras de este segundo ensayo también se midió el contenido total de carotenoides y clorofilas mediante HPLC, observándose de nuevo un descenso tanto de las clorofilas como de los carotenoides en respuesta al tratamiento de sombra simulada (W+FR) (Figura Suplementaria 7). Aunque en este caso las diferencias no son significativas ($P_{\text{valor}}: 0.989$).

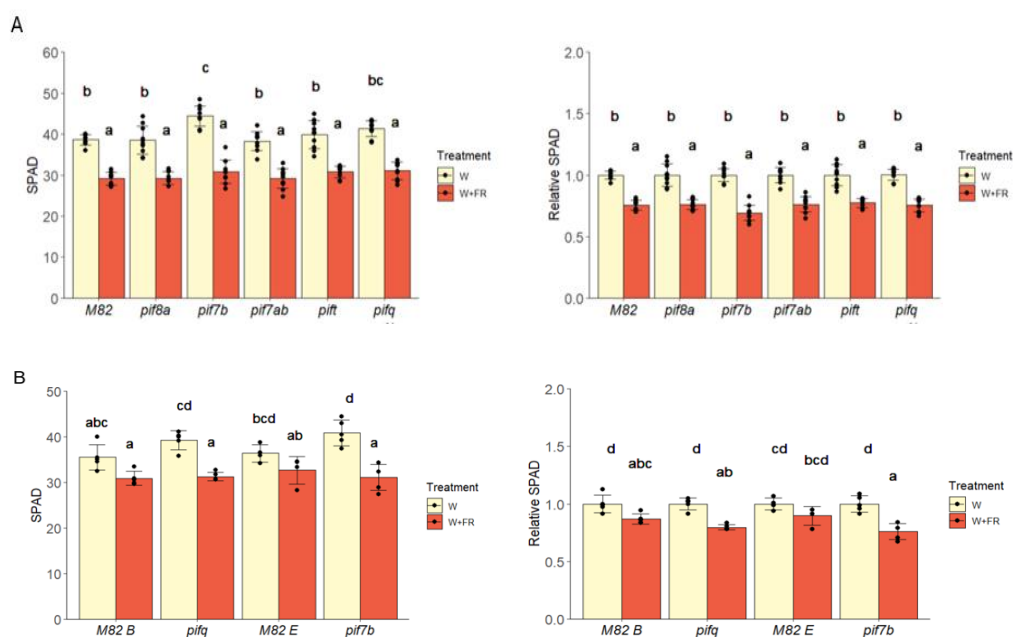


Figura 29. A y B) Análisis de la acumulación de clorofila (SPAD) del control y las diferentes líneas mutantes del ensayo. En los gráficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

c) Rendimiento fotosintético

Respecto al rendimiento fotosintético de las plantas, medido mediante el LICOR, no se han observado diferencias estadísticamente significativas ni entre los tratamientos lumínicos (W o W+FR), ni entre los distintos genotipos ya que todos responden de la misma manera (Figura 30A). Esto indica que la eficiencia fotosintética efectiva del fotosistema II (PhiPS2) no es un parámetro alterado por estos factores. Este mismo resultado se obtuvo en el segundo experimento realizado únicamente con los controles (M82B y M82E) y los mutantes *pif7b* y *pif4/7a/7b/8a* (Figura 30B).

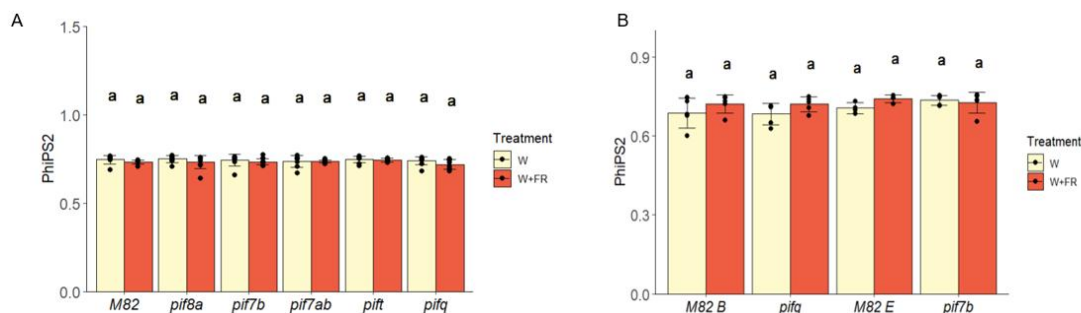


Figura 30. A) Análisis del rendimiento fotosintético efectivo del PSII (PhiPS2) del control y las líneas mutantes en W y W+FR. B) Análisis del rendimiento fotosintético efectivo del PSII (PhiPS2) de los controles M82 y las líneas mutantes *pif4/7a/7b/8a* y *pif7b* en W y sombra simulada (W+FR).

DISCUSIÓN

La luz es uno de los factores abióticos más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que regula procesos esenciales como la fotosíntesis y la fotomorfogénesis. Sin embargo, en condiciones de sombra o alta densidad de cultivo, la disponibilidad de luz por planta disminuye significativamente, lo que limita el desarrollo y la productividad, especialmente en especies sensibles a estas limitaciones lumínicas (Kurepin et al., 2014). Este problema actualmente es de gran relevancia, ya que se busca optimizar y maximizar la producción agrícola en espacios reducidos. Para lograr esto, es necesario sembrar una mayor cantidad de plantas en un espacio menor, lo que conlleva un aumento de la competencia entre las mismas y un incremento de las condiciones de sombra (Board, 2000; Grant, 1997). En este contexto, es importante tener en cuenta que las plantas pueden clasificarse en dos tipos según su comportamiento ante estas circunstancias: aquellas tolerantes a la sombra y aquellas sensibles a la sombra.

Las plantas sensibles tienden a elongar en condiciones de sombra (bajo R:FR), lo que provoca una reducción en su producción, mientras que las tolerantes muestran una mejor adaptación (Martinez-García et al., 2023). El objetivo de este proyecto ha sido identificar plantas de tomate que presenten una mayor tolerancia a las condiciones de alta densidad de cultivo, de modo que su crecimiento y producción sean equivalentes a los obtenidos en cultivos de baja densidad. Este enfoque es clave para optimizar el uso de los recursos disponibles y contribuye a la implementación de sistemas agrícolas más sostenibles y productivos.

1. Diferencias entre el crecimiento en condiciones de alta densidad (HD) y el crecimiento en condiciones de sombra simulada (W+FR)

Inicialmente se realizó un ensayo con plantas silvestres con fondo genético de M82 crecidas en baja densidad (LD) y comparando condiciones de alto y bajo R:FR (W vs W+FR), así como en alta densidad (HD) y W (Figura 6). El objetivo principal de este estudio era determinar si las plantas crecidas en LD, pero en W+FR, presentaban un comportamiento y crecimiento similar al de las plantas crecidas en HD. Todas las plantas de este experimento presentan el mismo PAR (146) aunque el R:FR es menor en las plantas crecidas en W+FR vs W (0.12 vs 4.88) y HD, debido a las condiciones de sombra que se generan por la proximidad de la vegetación.

Las respuestas de la planta a las variaciones en la cantidad y calidad de la luz están mediadas por la sensibilidad de los fitocromos y la regulación de las hormonas endógenas. En condiciones de W y LD, los fitocromos se encuentran mayoritariamente en su forma activa (Pfr). En este contexto, el *phyA*, al ser fotolábil, se degrada mediante la vía del proteasoma 26S dependiente de ubiquitina. Sin embargo, el *phyB* se estimula, interactuando con la familia PIF. Esta interacción conduce a la fosforilación de los PIF, reprimiendo así el SAS (Krahmer et al., 2023).

Sin embargo, cuando el R:FR disminuye porque o bien se suplementa con FR o bien la densidad aumenta, los fitocromos se inactivan. En estas circunstancias, los PIFs se desfosforilan e inducen la expresión de genes promotores de crecimiento y represores de la fotomorfogénesis, lo que provoca la elongación de la planta y la pérdida de pigmentos fotosintéticos.

Estudios previos han demostrado que las plantas de *Arabidopsis* deficientes en el *phyB* muestran características como una mayor elongación y un aumento en la expansión foliar en respuesta a cambios en el R:FR (Devlin et al., 1998). Estas evidencias destacan el papel clave de los fitocromos en la regulación de las respuestas morfológicas y fisiológicas a la calidad de la luz.

Los resultados de este estudio muestran un aumento significativo en la longitud del hipocótilo de plántulas de tomate bajo condiciones de sombra simulada (W+FR) en comparación con las condiciones de W cuando las plantas crecen en LD (Figura 7A). Esto confirma que el tratamiento W+FR

implementado en nuestro laboratorio induce una elongación del hipocótilo cuando las plantas crecen de forma aisladas o en densidades de plantación reducidas. Este comportamiento indica que las plantas perciben la disminución del R:FR como una señal temprana para detectar la proximidad de plantas adyacentes. Esto les permite elongar antes de enfrentarse a una situación de sombra real (Ballaré et al., 1994).

La menor elongación del hipocótilo bajo condiciones de HD, equiparable a la elongación observada en LD bajo W (Figura 7A), evidencia el efecto combinado de la calidad de la luz y la densidad de plantación sobre el crecimiento de las plantas.

En HD, aunque el *phyA* puede acumularse debido a la disminución en el R:FR, las condiciones competitivas pueden inhibir la activación completa de los mecanismos moleculares que promueven la elongación (Horn 1971; Harper 1977), como la desfosforilación de los factores PIF y la activación de genes promotores del crecimiento. Este fenómeno está asociado con el denominado *canopy shade*, caracterizado por un R:FR fuertemente reducido (<0.1) y una menor intensidad de luz en la región PAR. Esto contrasta con la respuesta observada en LD bajo W+FR, donde las plantas disponen de los recursos lumínicos suficientes para activar completamente las vías que inducen la elongación (Figura Suplementaria 1).

Se ha demostrado que los internodos actúan como receptores de FR y que su elongación sigue un patrón similar al del hipocótilo (Figura 7B). Esto coincide con lo reportado por Canham (1975), quien observó que tanto la longitud de las plantas como el número de nudos aumentan en condiciones de baja irradiación. Aunque se esperaría que las plantas en HD sean más altas o tengan internodos más largos, un estudio llevado a cabo por Huld et al., (1997) muestra que las plantas en LD elongaron más y produjeron más hojas. Esto ocurre porque la luz reflejada desde la base de las hojas mejora la penetración lumínica hacia las plantas vecinas, favoreciendo la fotosíntesis en las hojas inferiores, mientras que en HD la reducción de luz en las partes superiores limita el crecimiento.

Todos los resultados obtenidos a lo largo del proyecto muestran como a medida que disminuye el R:FR, el área foliar de las plantas aumenta. Esto refleja una estrategia adaptativa en respuesta a la sombra simulada o a la competencia lumínica, ya que, en entornos con menor disponibilidad de luz, las plantas tienden a expandir su superficie foliar como mecanismo para maximizar la captación de luz necesaria para la fotosíntesis.

El experimento realizado, considerando el efecto borde y las diferencias en el tamaño de las plantas, ha permitido concluir que la densidad de cultivo influye directamente en la desigualdad del tamaño entre plantas. En densidades bajas, donde hay poca competencia, las plantas tienden a desarrollar tamaños más uniformes. Sin embargo, a medida que la densidad aumenta y la competencia entre plantas se intensifica, también lo hace la desigualdad en el tamaño (Figura Suplementaria 2A).

Por ello, en condiciones de HD se observan diferencias en la longitud de las plantas, distinguiéndose entre plantas grandes (HDg) y pequeñas (HDp) (Figura Suplementaria 1). Esta conclusión es respaldada por un estudio realizado por Edmeades y Daynard sobre la variabilidad en el tamaño en cosechas secuenciales de maíz (*Zea mays*) cultivado a cuatro densidades diferentes, el cual concluye que el tamaño de las plantas aumentó a medida que aumentaba la densidad de plantación.

Estos resultados confirman que la densidad de plantación actúa como un factor modulador de las respuestas inducidas por la calidad de la luz, resaltando la importancia de considerar el contexto competitivo al evaluar las respuestas morfológicas y fisiológicas de las plantas a las variaciones lumínicas.

2. Efecto de los genes PIF de tomate en la respuesta a sombra simulada (W+FR)

2.1 Efecto de los genes codificantes para PIF1

El genotipado de las líneas mutantes de PIF1a, mostró dos alelos que presentaban mutaciones en su secuencia nucleotídica. En *pif1a.1* se observa la inserción de una adenina que altera el marco de lectura y provoca la pérdida de dominios funcionales esenciales para la estructura proteica, resultando en una pérdida de función. Por otro lado, *pif1a.2* muestra una deleción de 12 nucleótidos, cuya implicación funcional fue evaluada en el presente estudio (Figura 10 y 11).

Para comprobar la pérdida de función de las líneas mutantes de PIF1a, Miguel Simón Moya analizó el desarrollo de los pelos radiculares de las plántulas de tomate. En condiciones normales, tal y como se observó en el WT, las plantas desarrollan pelos radiculares en sus raíces. Sin embargo, los resultados mostraron que ni el mutante simple *pif1a.1* ni el doble mutante *pif1a/1b* presentaban pelos radiculares, mientras que el WT y el mutante *pif1b* si los presentan.

En el presente estudio, se evaluó el desarrollo de los pelos radiculares para determinar si la deleción en *pif1a.2* implica una pérdida de función. Los resultados en cuanto a los pelos radiculares hacen suponer que sí, ya que al igual que *pif1a.1* carecen de pelos radiculares (Figura 12). Estos resultados indican que la deleción identificada, aunque no altera el marco de lectura, si implica una pérdida en la funcionalidad de la proteína, probablemente debido a una alteración en la estructura tridimensional de la proteína por la ausencia de estos 4 aminoácidos. Estos resultados confirman que ambos alelos de *pif1a* son de pérdida de función y podrían utilizarse para futuras investigaciones.

Una vez confirmada la pérdida de función de los alelos de *pif1a*, se evaluó su efecto, junto con el del doble mutante *pif1a/1b* sobre la elongación del hipocótilo en condiciones de W+FR, comparándolo con las condiciones de crecimiento bajo W (Figura 14A). Los resultados muestran que tanto en los genotipos mutantes (*pif1a.1*, *pif1a.2* y *pif1a/1b*) como en el control (MT) no se observan diferencias significativas entre W+FR y W. Esto sugiere que el tomate MT no responde significativamente a la sombra, impidiendo sacar conclusiones robustas sobre si las mutaciones en PIF1a afectan directamente a la capacidad de las plantas para responder a sombra.

En cualquier caso, el doble mutante *pif1a/1b*, muestra una tendencia a una menor elongación en condiciones de W+FR (Figura 14A). Esto podría indicar que en los mutantes simples de *pif1a*, PIF1b está supliendo parcialmente la función de PIF1a, compensando la pérdida de función de este gen, por eso en las plantas *pif1a/1b*, debido a la ausencia de ambos genes se ha visto una mayor tolerancia a la sombra.

En conclusión, PIF1b puede tener un efecto modulador en ausencia de PIF1a. Sin embargo, en futuros experimentos habría que asegurar que el control no editado (MT) responde de forma significativa a sombra (por ejemplo, ajustando las condiciones experimentales) así como incluir el genotipo *pif1b* en el análisis de elongación.

El contenido total de carotenoides en los mutantes de PIF1a no mostró diferencias significativas entre genotipos ni entre tratamientos lumínicos, aunque se observó una tendencia general a una disminución de los carotenoides bajo W+FR (Figura Suplementaria 6). Destaca el mutante *pif1a.2*, que mantiene niveles similares de carotenoides tanto en W como en W+FR. No obstante, la elevada dispersión de datos en este genotipo sugiere que los resultados podrían no ser del todo fiables y deberían ser confirmados mediante nuevos experimentos. En este sentido, aunque los datos no permiten concluir con certeza un papel claro de PIF1a en la regulación de la síntesis de carotenoides, el comportamiento de *pif1a.2* plantea una posible alteración funcional que merece un análisis más detallado.

2.2 Efecto de los genes codificantes para PIF7 y otros PIF

Uno de los objetivos principales de este proyecto fue estudiar la respuesta de PIF7 bajo diferentes condiciones lumínicas, con el fin de determinar si es tolerante a la sombra. PIF7 es especialmente interesante debido a su fotoestabilidad, una característica que desempeña un papel muy importante en la regulación de las respuestas de la planta a las diferentes condiciones lumínicas, especialmente en condiciones de sombra o alta densidad de cultivo.

A diferencia de otros factores de transcripción de la familia PIF, como PIF1 o PIF4, que son rápidamente degradados en presencia de alto R:FR, PIF7 se mantiene estable bajo estas condiciones. Se decidió hacer líneas mutantes de tomate con pérdida de función de los dos genes que codifican para homólogos de PIF7 (*PIF7a* y *PIF7b*) porque este es un genotipo de interés debido a su papel en la elongación del hipocótilo y su posible relación con la tolerancia a la sombra en *Arabidopsis* (Rosado et al., 2016; Morelli et al., 2021).

En el presente estudio, se ha llevado a cabo el genotipado y análisis fenotípico del doble mutante de PIF7 en fondo MT (*pif7a/7b*), proporcionado por Esteban Burbano. Para la realización de este análisis se seleccionaron 3 líneas mutantes de pérdida de función: P3.8, P3.14 y P4.25 (Figura 19). Los resultados mostraron diferencias significativas en la respuesta de elongación del hipocótilo y del primer internodo bajo W+FR entre los diferentes genotipos (Figuras 20 A y B). Mientras que los individuos P3.8 y P3.14 presentan una elongación significativamente mayor en W+FR en comparación con la elongación en W, el individuo P4.25 no presenta diferencias significativas entre estas dos condiciones lumínicas.

Analizando las secuencias nucleotídicas de cada línea, se observa que P3.8 y P3.14 difieren únicamente en la mutación de PIF7a, mientras que ambas comparten la misma mutación en PIF7b (Figura 17). Esto indica que la mutación compartida en PIF7b no parece influir de manera relevante en la respuesta, al igual que ninguna de las deleciones que presentan en PIF7a. Por otro lado, la línea P4.25 presenta una mutación distinta en PIF7b, caracterizada por una deleción de 64 pares de bases y un cambio de adenina por guanina. Esta mutación podría explicar la respuesta más atenuada a la sombra que presenta este individuo, al elongar de manera similar en condiciones de luz y sombra (Figura 20A) y su mayor acumulación de pigmentos fotosintéticos (Figura 22), en comparación con P3.8 y P3.14.

Estos resultados sugieren que PIF7b podría estar desempeñando un papel crucial en la regulación de la elongación en respuesta a sombra simulada (W+FR), lo que evidencia la importancia de este gen como regulador de las adaptaciones de las plantas a entornos de bajo R:FR.

Con el objetivo de comprobar si el mutante *pif7b* en fondo genético M82, una variedad que responde más a nuestras condiciones de sombra que MT, presenta el fenotipo de tolerancia esperado, se evaluó su respuesta a W+FR, junto con la de otros mutantes cedidos por Y. Burko (*pif8a*, *pif7a/7b*, *pif4/7a/7b* y *pif4/7a/7b/8a*) (Figura 24A). El hecho de realizar los experimentos en diferente fondo genético permite comparar y evaluar la replicabilidad de los resultados obtenidos en diferentes variedades.

Los resultados obtenidos muestran como los mutantes simples (*pif8a* y *pif7b*) tienen un efecto limitado en la inhibición de la respuesta a la sombra simulada (Figura 26A), indicando que en su contribución al fenotipo de tolerancia a sombra es reducida o nula.

Las diferencias observadas en la respuesta de PIF7b entre los experimentos realizados, podría deberse a la divergencia genética de las variedades que hacen que el papel de cada gen en la regulación de la respuesta a sombra simulada sea distinto. Estas divergencias evidencian la importancia de considerar el fondo genético como un factor clave en este tipo de estudios, ya que puede influir significativamente en los fenotipos observados.

Considerando la importancia del fondo genético y la replicabilidad de los resultados en este tipo de estudios, se llevó a cabo un análisis comparativo en el que se incluyeron diferentes controles de plantas silvestres M82, empleadas como WT, y sus respectivas líneas mutantes. Por un lado, se analizó el mutante *pif7b* con su respectivo WT, y por otro lado, *pif4/7a/7b/8a* junto con el WT de Y. Burko (Figura 28).

Los resultados revelaron diferencias significativas en términos de elongación bajo el tratamiento de W+FR, entre los dos controles, a pesar de pertenecer a la misma variedad. En particular, el WT utilizado en el laboratorio mostró una mayor elongación en estas condiciones (Figura 27A). Esto sugiere que, aunque ambos controles compartan el mismo fondo genético, las mutaciones acumuladas y la selección artificial durante el manejo de las plantas pueden derivar en diferencias fenotípicas entre líneas que en principio deberían comportarse igual.

Por otro lado, se observó que las plantas mutantes *pif7b* en W eran inicialmente más pequeñas que las mutantes *pif4/7a/7b/8a* bajo el mismo tratamiento. Esto hace que la elongación en respuesta a W+FR sea más notoria en *pif7b* (Figura 27A y 28), aunque podría deberse simplemente a su menor tamaño inicial. Lo que resalta la importancia de considerar las características iniciales de las plantas.

En cuanto a la acumulación de carotenoides y clorofilas, todos los experimentos realizados a lo largo del proyecto presentan el mismo patrón, en el que, bajo W+FR, la acumulación de estos pigmentos fotosintéticos en las hojas disminuye en comparación con la presente en W (Figura Suplementaria 3, 6 y 7). Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios previos (Soy et al., 2014; Bou-Torrent et al. 2015; Morelli et al., 2021), donde se demuestra que la acumulación de pigmentos fotosintéticos se reduce bajo condiciones de sombra.

El análisis de rendimiento fotosintético revela que todos los mutantes presentan valores equivalentes tanto en W como en W+FR, lo que refuerza la idea de que los PIF analizados no están involucrados en la regulación del rendimiento fotosintético efectivo del PSII (PhiPS2). Estos resultados sugieren que estos PIFs se centran más en la regulación del crecimiento en respuesta a la sombra simulada, que en los procesos metabólicos relacionados con la fotosíntesis.

En términos generales, los resultados obtenidos a lo largo del proyecto destacan que no todos los PIF están involucrados en los mismos procesos fisiológicos o no tienen el mismo peso en estos, lo que evidencia la diversidad funcional dentro de esta familia de factores de transcripción. Mientras que algunos PIFs parecen tener un papel fundamental en la respuesta a la sombra, otros no muestran un efecto significativo en los parámetros analizados, como el rendimiento fotosintético o la acumulación de clorofila.

Además, es importante tener en cuenta que algunos PIF han sido menos estudiados y podrían presentar funciones aún no identificadas o funciones diferentes dependiendo del fondo genético y las condiciones experimentales. Además, los resultados obtenidos confirman la idea de que la interacción combinada de varios PIF es clave para regular el crecimiento adaptativo en condiciones de sombra simulada (W+FR).

Se puede concluir que las mutaciones individuales en cualquiera de los genes PIF estudiados no generan una respuesta significativa de tolerancia a W+FR, lo que indica que ninguno de ellos actúa como un “*master gene*” o regulador único de este fenómeno. Sin embargo, las combinaciones de mutantes triples o cuádruples muestran fenotipos progresivamente más marcados, confirmando la acción aditiva y complementaria de estos factores en el control del crecimiento bajo condiciones de sombra simulada (W+FR) (Zhang et al., 2013).

El claro ejemplo de esta interacción es el cuádruple mutante *pifq* (*pif4/7a/7b/8a*). Este genotipo destaca porque, en W+FR, muestra una elongación del hipocótilo y del internodo notablemente más atenuada que el resto de los genotipos analizados (Figura 25A y 26), lo que indica que presenta una capacidad

mejorada para tolerar estas condiciones. Esto refuerza la hipótesis de que la acción combinada de estos factores es esencial para regular eficazmente la respuesta de tolerancia a la sombra en las plantas.

En conclusión, el genotipo *pif4/7a/7b/8a* es un excelente candidato para futuros estudios de tolerancia a sombra en plantas, ya que su caracterización más detallada podría aportar información relevante para optimizar el crecimiento y la productividad de las plantas en ambientes sombreados. El único problema es que al ser una línea editada no se pueden realizar ensayos de campo ni comercializar con ella bajo la legislación europea actual.

CONCLUSIONES

La luz regula procesos esenciales en las plantas, como la fotosíntesis y la fotomorfogénesis. En condiciones de alta densidad (HD) o de sombra simulada (W+FR).

1. Las plantas perciben un bajo R:FR como señal que activa respuestas fisiológicas, como la elongación del hipocótilo y el incremento del área foliar, estrategias adaptativas que buscan maximizar la captación de luz.
2. Los fitocromos perciben la señal de bajo R:FR y la traducen promoviendo la actividad de los PIF, factores de transcripción que regulan los genes implicados en la respuesta a sombra.
3. En tomate, PIF1a y PIF1b tienen funciones específicas y complementarias en la regulación de la elongación bajo W+FR. La pérdida de función de estos genes causa ligeras alteraciones en la respuesta a sombra, mientras que la respuesta del doble mutante, sugiere una acción compensatoria entre ellos.
4. La combinación de mutaciones en múltiples PIF (*pif4/7a/7b/8a*) es necesaria para obtener un fenotipo claro de tolerancia a la sombra simulada.
5. Las diferencias encontradas en la respuesta a sombra entre las distintas variedades de tomate ensayadas (M82 y Microtom) e incluso entre líneas de la misma variedad (M82B y M82 E) resaltan el impacto del fondo genético y la selección artificial en los resultados experimentales.
6. El genotipo cuádruple mutante *pifq* (*pif4/7a/7b/8a*) destaca como el más interesante para futuros ensayos encaminados a optimizar la producción agrícola en sistemas de HD o de suplementación con FR, promoviendo sistemas más sostenibles y productivos.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, E., Diaz, C., Hong, J.-P., & Shin, R. (2014). 14-3-3 proteins participate in light signaling through association with PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(12), 22801–22814. <https://doi.org/10.3390/ijms151222801>
- Ahmad, M., & Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, *366*(6451), 162–166. <https://doi.org/10.1038/366162a0>
- Bae, G., & Choi, G. (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual Review of Plant Biology*, *59*(1), 281–311. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092859>
- Ballaré, C. L. (1999). Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends in Plant Science*, *4*(5), 201. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01408-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01408-9)
- Ballaré, C. L., Scopel, A. L., Jordan, E. T., & Vierstra, R. D. (1994). Signaling among neighboring plants and the development of size inequalities in plant populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(21), 10094–10098. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.10094>
- Bou-Torrent, J., Toledo-Ortiz, G., Ortiz-Alcaide, M., Cifuentes-Esquivel, N., Halliday, K. J., Martínez-García, J. F., & Rodríguez-Concepcion, M. (2015). Regulation of carotenoid biosynthesis by shade relies on specific subsets of antagonistic transcription factors and cofactors. *Plant Physiology*, *169*(3), 1584–1594. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00552>
- Briggs, W. R., & Huala, E. (1999). Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *15*(1), 33–62. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.33>
- Bu, Q., Zhu, L., & Huq, E. (2011). Proteasome-mediated degradation of FRIGIDA modulates flowering time in *Arabidopsis* during vernalization. *The Plant Cell*, *23*(2), 476–494.
- Canham, R. (1975). Horticultural significance of photomorphogenesis. In H. Smith & D. G. Kumar (Eds.), *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals* (pp. 597–614). Springer.
- Casal, J. J. (2012). Shade avoidance. *The Arabidopsis Book*, *10*, e0157. <https://doi.org/10.1199/tab.0157>
- Casal, J. J. (2013). Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 403–427. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120221>
- Chen, M., Chory, J., & Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*, *38*(1), 87–117. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092259>
- Child, R., & Smith, H. (1987). The Shade Avoidance Syndrome: Multiple Responses Mediated by Multiple Phytochromes.
- Chory, J. (1993). Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends in Genetics: TIG*, *9*(5), 167–172. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90163-c](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90163-c)
- Christie, J. M., & Briggs, W. R. (2001). Blue light sensing in higher plants. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(20), 17620. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)31957-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)31957-x)
- de Carbonnel, M., Davis, P., Roelfsema, M. R. G., Inoue, S.-I., Schepens, I., Lariguet, P., Geisler, M., Shimazaki, K.-I., Hangarter, R., & Fankhauser, C. (2010). The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiology*, *152*(3), 1391–1405. <https://doi.org/10.1104/pp.109.150441>

- Deng, X. W. (1994). Fresh view of light signal transduction in plants. *Cell*, 76(3), 423–426. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90107-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90107-4)
- Devlin, P. F., Yanovsky, M. J., & Kay, S. A. (2003). A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 133(4), 1617–1629. <https://doi.org/10.1104/pp.103.034397>
- Devlin, Paul F., Patel, S. R., & Whitelam, G. C. (1998). Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *The plant cell*, 10(9), 1479. <https://doi.org/10.2307/3870612>
- Dong, J., Terzaghi, W., Deng, X. W., & Chen, H. (2015). Multiple photomorphogenic repressors work in concert to regulate *Arabidopsis* seedling development. *Plant Signaling & Behavior*, 10(3), e1011934. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1011934>
- Fantini, E., Falcone, G., Frusciante, S., Giliberto, L., & Giuliano, G. (2013). Dissection of tomato lycopene biosynthesis through virus-induced gene silencing. *Plant Physiology*, 163(2), 986–998. <https://doi.org/10.1104/pp.113.224733>
- Fernando, V. C. D., & Schroeder, D. F. (2016). Shedding light on plant development: light signalling in the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Ceylon journal of science*, 45(1), 3. <https://doi.org/10.4038/cjs.v45i1.7359>
- Franklin, K. A. (2005). Phytochrome-mediated developmental responses to light and temperature. *Journal of Experimental Botany*, 56(410), 3105–3112.
- Franklin, Keara A. (2008). Shade avoidance. *The New Phytologist*, 179(4), 930–944. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02507.x>
- Fray, R. G., & Grierson, D. (1993). Molecular genetics of tomato fruit ripening. *Trends in Genetics: TIG*, 9(12), 438–443. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90108-t](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90108-t)
- Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J., & Martínez-García, J. F. (2011). The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: a fundamental role for atypical basic helix-loop-helix proteins as transcriptional cofactors: Non-DNA-binding bHLHs and shade avoidance. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 66(2), 258–267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04485.x>
- Galstyan, A., Cifuentes-Esquivel, N., Cheng, Y., & Martínez-García, J. F. (2011). Phytochrome signaling in *Arabidopsis*: Impact assessment of a mutually negative phyB-PIF interaction. *The Plant Journal*, 66(2), 258–267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04485.x>
- Giorio, G., Stigliani, A. L., & Ambrosio, C. (2008). Overexpression of a bacterial carotenoid gene in tomato enhances phytoene and β -carotene content without affecting plant growth and development. *Plant Molecular Biology*, 67(3), 225–238.
- Gramegna, G., Rosado, D., Sánchez Carranza, A. P., Cruz, A. B., Simon-Moya, M., Llorente, B., Rodríguez-Concepción, M., Freschi, L., & Rossi, M. (2019). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3 mediates light-dependent induction of tocopherol biosynthesis during tomato fruit ripening: SIPIF3 regulates tocopherol biosynthesis. *Plant, Cell & Environment*, 42(4), 1328–1339. <https://doi.org/10.1111/pce.13467>
- Grant, R. H. (1997). Partitioning of biologically active radiation in plant canopies. *International journal of biometeorology*, 40(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s004840050014>
- Hadjichristodoulou, A. (1993). Edge effects on yield, yield components and other physiological characteristics in cereals and oilseed crops. *The Journal of Agricultural Science*, 120(1), 7–12. <https://doi.org/10.1017/s0021859600073536>

- Harper, J. L. (1977). Population biology of plants.
- Horn, H. S. (1971). The Adaptive Geometry of Trees. *Princeton University Press*.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., & Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *The EMBO Journal*, 28(24), 3893–3902. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.306>
- Hu, X., Kong, X., Wang, C., Ma, L., Zhao, J., Wei, J., Zhang, X., Loake, G. J., Zhang, T., Huang, J., & Yang, Y. (2014). Proteasome-mediated degradation of FRIGIDA modulates flowering time in Arabidopsis during vernalization. *The Plant Cell*, 26(12), 4763–4781. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132738>
- Huang, H., Yoo, C. Y., Bindbeutel, R., Goldsworthy, J., Tielking, A., Alvarez, S., Naldrett, M. J., Evans, B. S., Chen, M., & Nusinow, D. A. (2016). PCH1 integrates circadian and light-signaling pathways to control photoperiod-responsive growth in Arabidopsis. *eLife*, 5, e13292. <https://doi.org/10.7554/eLife.13292>
- Huld, H., & Thorsteinsson, I. (1997). Dynamics of internode and stem elongation in three cultivars of maize (*Zea mays* L.): Analysis of phases of elongation and their relationships to phytomer development. *Annals of Botany*, 80(6), 763–770.
- Jenkins, G. I. (2009). Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 407–431. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092953>
- Jim Board. (2000). Light interception efficiency and light quality affect yield compensation of soybean at low plant populations. *Crop Science*, 40(5), 1285–1294. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051285x>
- Kaiserli, E., & Jenkins, G. I. (2007). UV-B promotes rapid nuclear translocation of the Arabidopsis UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *The Plant Cell*, 19(8), 2662–2673. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053330>
- Kohnen, M. V., Schmid-Siegert, E., Trevisan, M., Petrolati, L. A., Sénéchal, F., Müller-Moulé, P., Maloof, J., Xenarios, I., & Fankhauser, C. (2016). Neighbor detection induces organ-specific transcriptomes, revealing patterns underlying hypocotyl-specific growth. *The Plant Cell*, 28(12), 2889–2904. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00463>
- Krahmer, J., Goraloglia, G. S., Kubota, A., Zardilis, A., & Lorrain, S. (2023). Phytochrome, PIF, and hormonal signaling pathways in light-regulated plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 74, 311–339.
- Kurepin, L. V., & Pharis, R. P. (2014). Light signaling and the phytohormonal regulation of shoot growth. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 229, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.10.006>
- Leivar, P., & Monte, E. (2014). PIFs: systems integrators in plant development. *The Plant Cell*, 26(1), 56–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120857>
- Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, 16(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.003>
- Li, J., Li, G., Wang, H., & Wang Deng, X. (2012). Constitutive photomorphogenesis 1 represses the photomorphogenic development of Arabidopsis seedlings by degrading phytochrome-interacting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22), 8289–8294.

- Lin, C., & Shalitin, D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 469–496. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.110901.160901>
- Llorente, B., Andrea, L., & Rodríguez-Concepción, M. (2016). Evolutionary recycling of light signaling components in fleshy fruits: new insights on the role of phytochromes in tomato fruit ripening. *New Phytologist*, 209(1), 378–391.
- Llorente, B., D'Andrea, L., Ruiz-Sola, M. A., Botterweg, E., Pulido, P., Andilla, J., Loza-Alvarez, P., & Rodríguez-Concepción, M. (2016). Tomato fruit carotenoid biosynthesis is adjusted to actual ripening progression by a light-dependent mechanism. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 85(1), 107–119. <https://doi.org/10.1111/tbj.13094>
- Macháčková, I. (1994). Kendrick, R.E., Kronenberg, G.H.M.: Photomorphogenesis in plants. 2nd Edition: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, 1994. 828 pp. *Biologia Plantarum*, 36(4), 564–564. <https://doi.org/10.1007/bf02921178>
- Martínez-García, J. F., & Rodríguez-Concepción, M. (2023). Molecular mechanisms of shade tolerance in plants. *The New Phytologist*, 239(4), 1190–1202. <https://doi.org/10.1111/nph.19047>
- Martínez-García, J. F., Galstyan, A., Salla-Martret, M., Cifuentes-Esquivel, N., Gallemí, M., & Bou-Torrent, J. (2010). Regulatory components of shade avoidance syndrome. *En Advances in Botanical Research* (pp. 65–116). Elsevier.
- Martínez-García, J. F., Huq, E., & Quail, P. H. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5467), 859–863. <https://doi.org/10.1126/science.288.5467.859>
- Mclaren, J. S., & Smith, H. (1978). Phytochrome control of the growth and development of *Rumex obtusifolius* under simulated canopy light environments. *Plant, Cell & Environment*, 1(1), 61–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1978.tb00748.x>
- Molina-Contreras, M. J., Medina, C., Román, B., Solano, R., & Rubio, V. (2019). Photoreceptor-mediated kinome reprogramming in response to neighbor detection. *Plant Physiology*, 180(2), 1232–1248. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00275>
- Molina-Contreras, M. J., Paulišić, S., Then, C., Moreno-Romero, J., Pastor-Andreu, P., Morelli, L., Roig-Villanova, I., Jenkins, H., Hallab, A., Gan, X., Gomez-Cadenas, A., Tsiantis, M., Rodríguez-Concepción, M., & Martínez-García, J. F. (2019). Photoreceptor activity contributes to contrasting responses to shade in Cardamine and Arabidopsis seedlings. *The Plant Cell*, 31(11), 2649–2663.
- Morales, F., Abadía, A., & Abadía, J. (2002). Los pigmentos fotosintéticos: Algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*, 12(1), 1–10.4
- Morelli, L., Paulišić, S., Qin, W., Iglesias-Sanchez, A., Roig-Villanova, I., Florez-Sarasa, I., Rodríguez-Concepción, M., & Martínez-García, J. F. (2021). Light signals generated by vegetation shade facilitate acclimation to low light in shade-avoider plants. *Plant Physiology*, 186(4), 2137–2151. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab206>
- Nagatani, A. (2004). Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6), 708–711. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.09.010>
- Ni, M., Tepperman, J. M., & Quail, P. H. (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95(5), 657–667. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81636-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81636-0)

- Oh, J., Park, E., Song, K., Bae, G., & Choi, G. (2020). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR8 inhibits phytochrome A-mediated far-red light responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 32(1), 186–205. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00515>
- Olle, M., et al. (2019). Photosynthetically active radiation and its impact on plant growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 1-10.
- Ouzounis, T., Rosenqvist, E., & Ottosen, C.-O. (2015). Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: A review. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science*, 50(8), 1128–1135. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.8.1128>
- Park, E., Park, J., Kim, J., Nagatani, A., Lagarias, J. C., & Choi, G. (2012). Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters: PhyB disrupts DNA binding of PIFs. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 72(4), 537–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05114.x>
- Paulišić, S., Qin, W., Arora Verasztó, H., Then, C., Alary, B., Nogue, F., Tsiantis, M., Hothorn, M., & Martínez-García, J. F. (2021). Adjustment of the PIF7-HFR1 transcriptional module activity controls plant shade adaptation. *The EMBO Journal*, 40(1), e104273. <https://doi.org/10.15252/embj.2019104273>
- Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J. M., Zhang, Y., & Quail, P. H. (2014). Combinatorial complexity in a transcriptionally centered signaling hub in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 7(11), 1598–1618. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu087>
- Pham, V. N., Kathare, P. K., & Huq, E. (2018). Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiology*, 176(2), 1025–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01384>
- Quail, P. (1991). Phytochrome: A light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annual review of genetics*, 25(1), 389–409. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.25.1.389>
- Rajapakse, N. C., Young, R. E., McMahon, M. J., & Oi, R. (1999). Plant height control by photosensitive filters: Current status and future prospects. *HortTechnology*, 9(4), 618–624. <https://doi.org/10.21273/horttech.9.4.618>
- Roig-Villanova, I., & Martínez-García, J. F. (2016). Plant responses to vegetation proximity: A whole life avoiding shade. *Frontiers in Plant Science*, 7, 236. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00236>
- Rosado, D., Gramegna, G., Cruz, A., Lira, B. S., Freschi, L., de Setta, N., & Rossi, M. (2016). Phytochrome interacting factors (PIFs) in *Solanum lycopersicum*: Diversity, evolutionary history and expression profiling during different developmental processes. *PloS One*, 11(11), e0165929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165929>
- Rosado, D., Trench, B., Bianchetti, R., Zuccarelli, R., Rodrigues Alves, F. R., Purgatto, E., Segal Floh, E. I., Silveira Nogueira, F. T., Freschi, L., & Rossi, M. (2019). Downregulation of PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 influences plant development and fruit production. *Plant Physiology*, 181(3), 1360–1370. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00833>
- Ryer, A. (1997). Light measurement handbook
- Scott JW, Harbaugh BK. 1989. Micro-Tom. A miniature dwarf tomato. *Florida Agricultural Experimental Station Circular S-370*, 1–6.

- Sessa, G., Carabelli, M., Possenti, M., Morelli, G., & Ruberti, I. (2018). Multiple pathways in the control of the shade avoidance response. *Plants*, 7(4), 102. <https://doi.org/10.3390/plants7040102>
- Shen, H., Zhu, L., Castillon, A., Majee, M., Downie, B., & Huq, E. (2008). Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from Arabidopsis depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *The Plant Cell*, 20(6), 1586–1602. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060020>
- Smith, H. (1982). Light quality, photoreceptors, and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology*, 33(1), 481–518.
- Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature*, 407(6804), 585–591. <https://doi.org/10.1038/35036500>
- Soy, J., Leivar, P., González-Schain, N., Sentandreu, M., Prat, S., & Quail, P. H. (2014). Phytochrome-imposed oscillations in PIF3 protein abundance regulate hypocotyl growth under diurnal light-dark conditions in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 78(2), 259–272. <https://doi.org/10.1038/35036500>
- Valladares, F., & Niinemets, Ü. (2008). Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39(1), 237–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173506>
- Warnasooriya, S. N., & Brutnell, T. P. (2014). Enhancing the productivity of grasses under high-density planting by engineering light responses: from model systems to feedstocks. *Journal of Experimental Botany*, 65(11), 2825–2834. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru221>
- Whitelam, G. C., & Halliday, K. J. (Eds.). (2007). Light and plant development. *Blackwell Publishing Ltd*. <https://doi.org/10.1002/9780470988893>
- Yang, Y., Liang, T., Zhang, L., Shao, K., Gu, X., Shang, R., & Liu. (2018). Phytochrome A Negatively Regulates Flowering in Arabidopsis in Red Light.
- Yanovsky, M. J., Izaguirre, M., Wagmaister, J. A., Gatz, C., Jackson, S. D., Thomas, B., & Casal, J. J. (2000). Phytochrome A resets the circadian clock and delays tuber formation under long days in potato: Resetting of the circadian clock by phyA. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 23(2), 223–232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00775.x>
- Zhang, Y., Mayba, O., Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J. M., Speed, T. P., & Quail, P. H. (2013). A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 9(1), e1003244. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003244>
- Zhen, S., van Iersel, M., & Bugbee, B. (2021). Why far-red photons should be included in the definition of photosynthetic photons and the measurement of horticultural fixture efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 12, 693445. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.693445>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

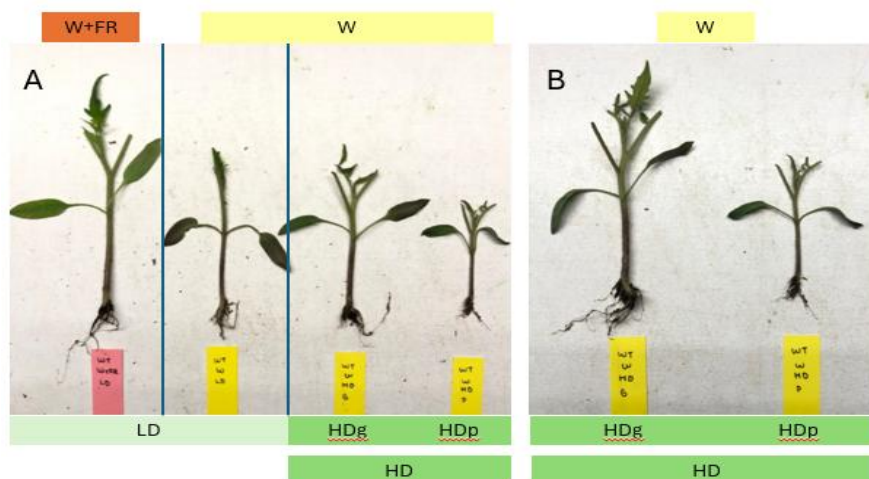


Figura Suplementaria 1. A) Planta silvestre M82 en LD bajo W+FR y W. Seguido del control en HD y W, diferenciado según su tamaño, HDg y HDp. B) Diferenciación por tamaño de las plantas de crecimiento en HD.

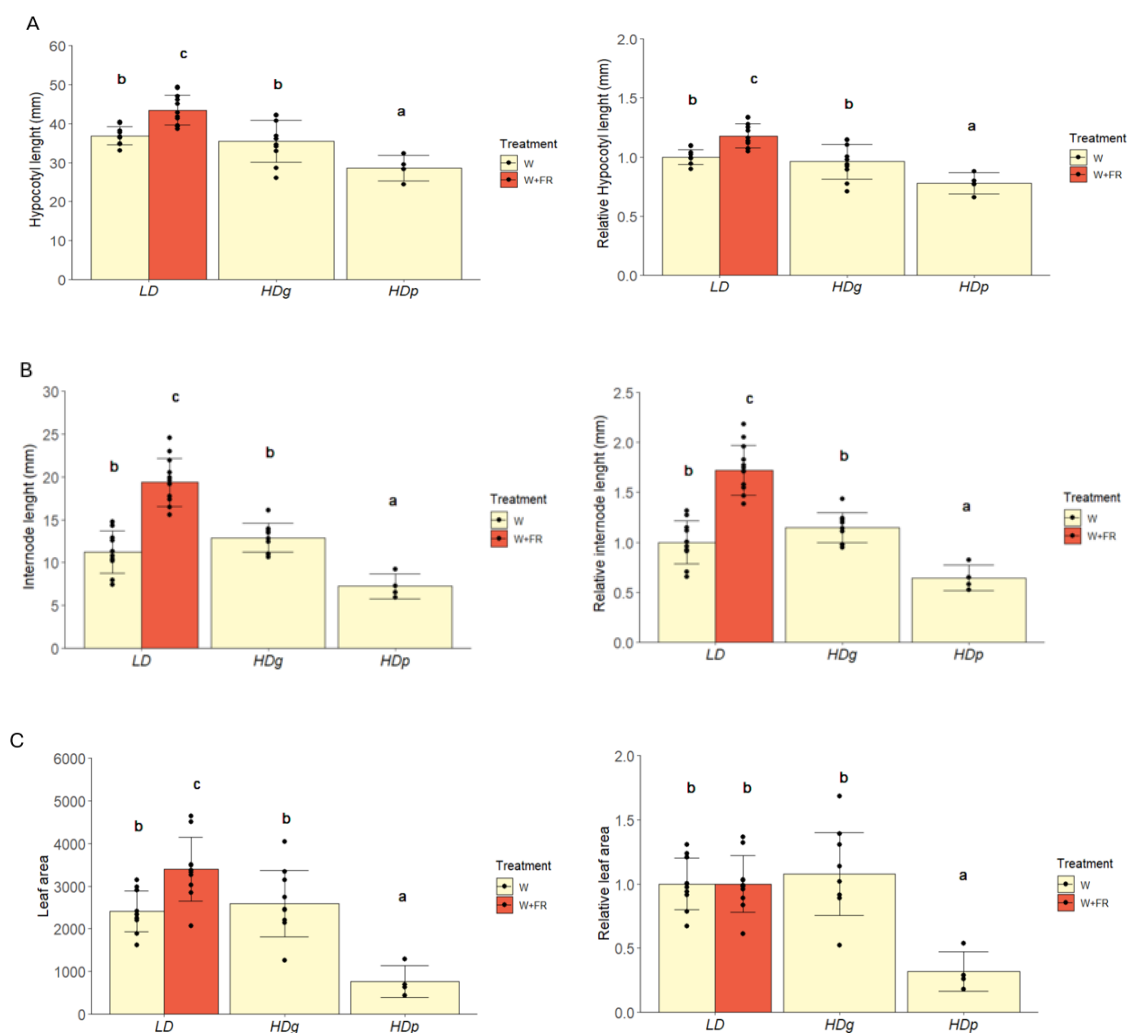


Figura Suplementaria 2. A) Análisis de la longitud del hipocótilo en LD y HD, diferenciando entre plantas HDg y plantas HDp, en función del tratamiento de W y W+FR. B) Análisis de la longitud del primer internodo en LD y HD, diferenciando entre plantas HDg y plantas HDp en función del tratamiento de W y W+FR. C) Análisis del área foliar en LD y HD (HDg y HDp) y en función del tratamiento de W y W+FR. En los gráficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

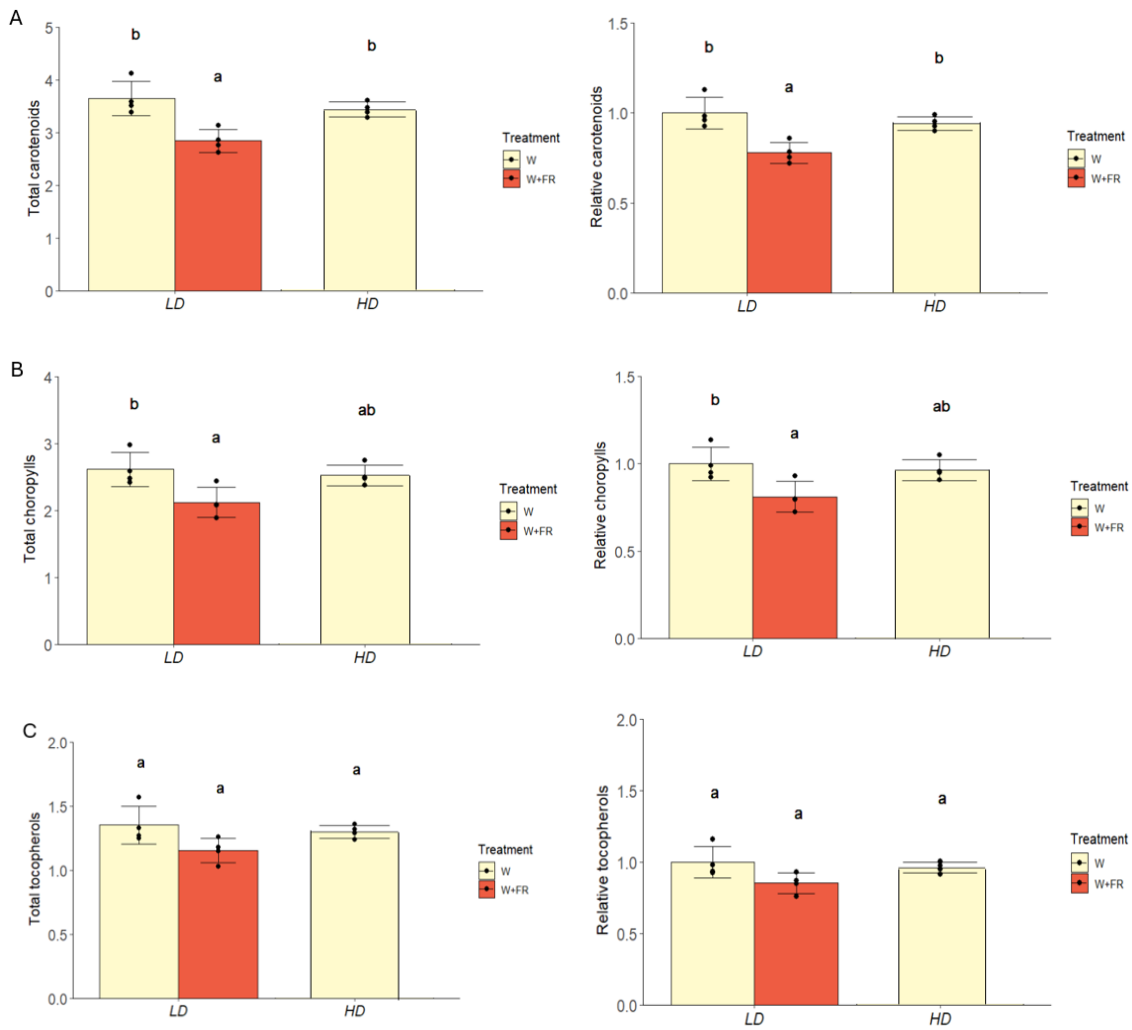


Figura Suplementaria 3. Respuestas a sombra simulada (W+FR vs W) y sombra de proximidad (HD vs LD). A) Contenido total de carotenoides en plantas M82. B) Contenido total de clorofilas en plantas M82. C) Contenido total de tocoferoles en plantas M82. En los graficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

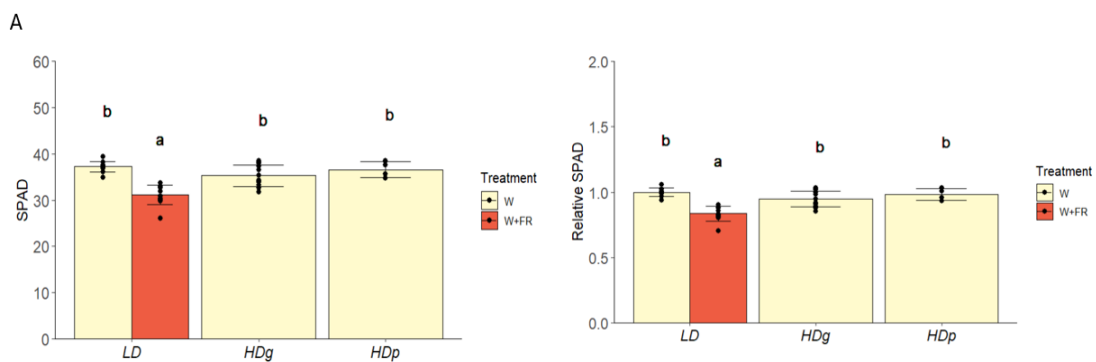


Figura Suplementaria 4. Acumulación de clorofilas bajo diferentes tratamientos lumínicos y de densidad teniendo en cuenta el efecto borde, diferenciando entre plantas grandes (HDg) y pequeñas (HDp) en HD.

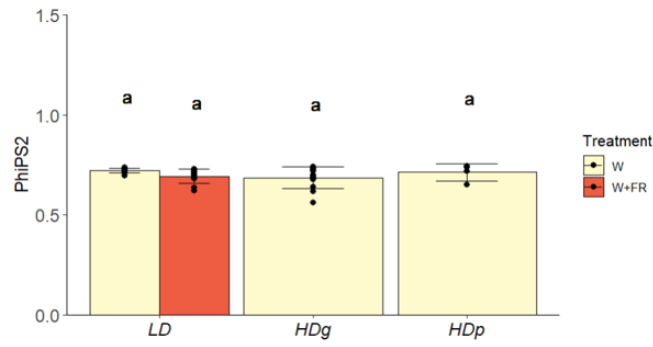


Figura Suplementaria 5. Rendimiento fotosintético del genotipo control bajo diferentes tratamientos lumínicos y de densidad teniendo en cuenta el efecto borde, diferenciando entre plantas grandes (HDg) y pequeñas (HDp) en HD.

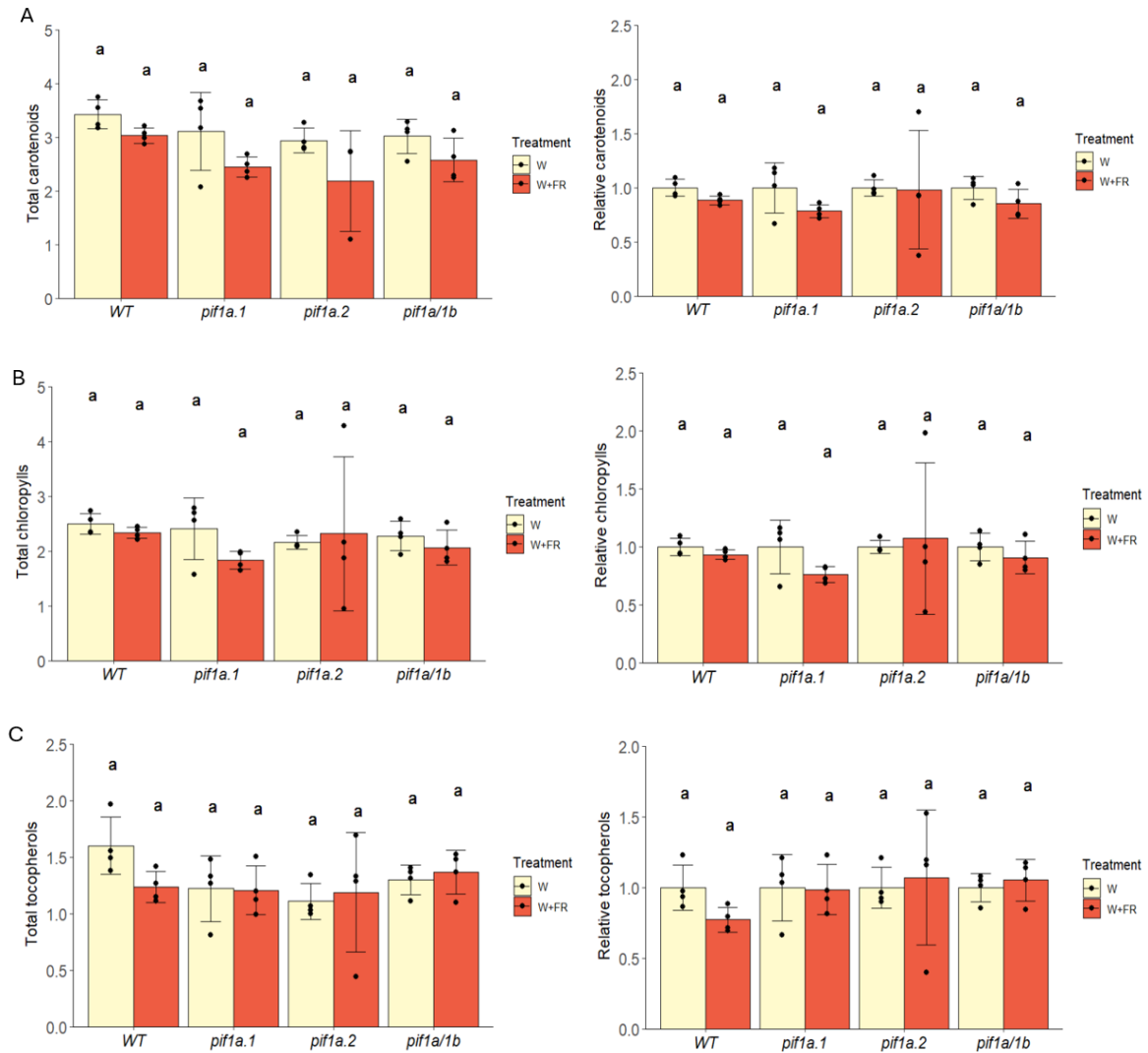


Figura Suplementaria 6. A) Contenido total de carotenoides del WT y los mutantes de PIF1. B) Contenido total de clorofilas del WT y los mutantes de PIF1. C) Contenido total de tocoferoles del WT y los mutantes de PIF1. En los graficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.

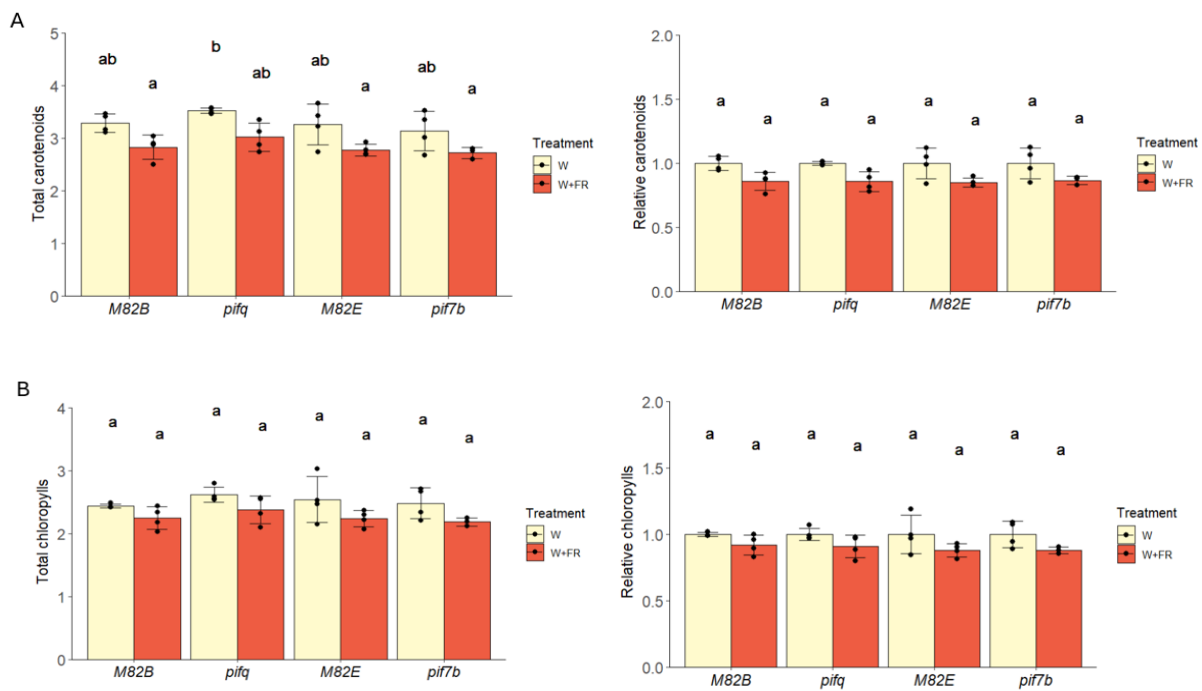


Figura Suplementaria 7. A y B) Análisis de la acumulación de carotenoides y clorofila del control y las líneas mutantes pif4/7a/7b/8a y pif7b. En los gráficos se muestra el análisis de los datos absolutos a la izquierda y sus respectivos datos relativizados a la derecha.