



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Contribución de GIGANTEA a la modulación circadiana de
la defensa frente a patógenos mediada por ácido
jasmónico.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Salazar Vergara, Rosa

Tutor/a: Bueso Ródenas, Eduardo

Director/a Experimental: NOHALES ZAFRA, MARIA ANGELES

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Trabajo Fin de Máster

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Contribución de GIGANTEA a la modulación circadiana de la defensa frente a patógenos mediada por ácido jasmónico

Rosa Salazar Vergara



Directora

María Ángeles Nohales Zafra

Tutor UPV

Eduardo Bueso Ródenas

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
1 INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 El reloj circadiano	10
1.2 Arquitectura molecular del reloj circadiano en el reino vegetal.....	11
1.3 Regulación temporal de la defensa frente al estrés biótico.....	12
1.4 Ruta de señalización del ácido jasmónico	14
1.5 Convergencia entre las rutas del etileno y del jasmónico	15
1.6 GIGANTEA como componente <i>hub</i> del reloj circadiano	16
1.7 Antecedentes e hipótesis.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo	24
3.2 Genotipado de las líneas mutantes	24
3.3 Esterilización de semillas y crecimiento <i>in vitro</i> de plántulas.....	24
3.4 Medidas de la sensibilidad fisiológica al ACC	25
3.5 Análisis estadístico y bioinformático.....	26
3.6 Generación de construcciones para los análisis de interacción <i>in vitro</i>	26
3.7 Ensayo de doble híbrido en levadura	27
3.8 Co-inmunoprecipitación <i>in vitro</i>	27
3.9 Ensayo de <i>titulación</i>	28
3.10 Extracción de RNA y RT-qPCR	28
3.11 Ensayo de infecciones con <i>Botrytis cinerea</i>	29
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Implicación de GI en la ruta de señalización por etileno	32
4.1.1 <i>Metanálisis de genes regulados por GI y EIN3/EIL1</i>	32
4.1.2 <i>Evaluación fisiológica de la sensibilidad a ACC</i>	33
4.2 Interacción <i>in vitro</i>	36
4.2.1 <i>Estudio de la potencial interacción entre GI, JAZ6 y EIL1</i>	36
4.2.2 <i>Estudio de la potencial competición molecular</i>	39
4.3 Participación de GI en la activación de respuestas defensivas	40
4.3.1 <i>Análisis de la expresión génica</i>	40
4.3.2 <i>Ensayos de infecciones con Botrytis cinerea</i>	41
5 DISCUSIÓN	44
6 CONCLUSIONES.....	50
7 BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la integración de las señales ambientales en el oscilador central vegetal	10
Figura 2. Esquema de la arquitectura molecular del reloj	12
Figura 3. Regulación circadiana de la ruta biosintética y de señalización del ácido jasmónico.....	13
Figura 4. Ruta de señalización del ácido jasmónico.....	15
Figura 5. Señalización por etileno y convergencia con JA.....	16
Figura 6. Actividad de GI en los procesos fisiológicos	18
Figura 7. Esquema de la hipótesis e investigaciones previas.....	20
Figura 8. Medida del ángulo de curvatura del gancho apical con Fiji.....	25
Figura 9. Diagramas de Venn con datos de EIN3.	32
Figura 10. Diagrama de Venn con datos del doble mutante <i>ein3;eil1</i>	33
Figura 11. Variación cuantitativa de la triple respuesta a etileno entre Col-0, <i>GI Ox</i> y <i>eil1</i>	34
Figura 12. Variación cuantitativa de la triple respuesta a etileno entre Col-0 y <i>gi-2</i>	35
Figura 13. Imágenes representativas de la respuesta a etileno de los genotipos Col-0, <i>GI Ox</i> , <i>eil1</i> y <i>gi-2</i>	36
Figura 14. Ensayo de doble híbrido.	37
Figura 15. Western-blot del ensayo de co-inmunoprecipitación entre GI y JAZ6 y EIL1	38
Figura 16. Western-blots del ensayo de co-inmunoprecipitación entre GI y EIL1.....	38
Figura 17. Western-blots del ensayo de titulación.	39
Figura 18. Expresión relativa de <i>CYP79B3</i> y <i>BCAT4</i> respecto a <i>PP2A</i>	40
Figura 19. Infecciones de Col-0 y <i>gi-2</i> con <i>Botrytis cinerea</i>	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de cebadores para el genotipado de los mutantes insercionales de T-DNA.....	24
Tabla 2. Diseño de cebadores para la generación de construcciones y secuenciación de pDONR207::JAZ6.....	26
Tabla 3. Listado de cebadores utilizados para las RT-qPCRs	29

RESUMEN

RESUMEN

El reloj circadiano es un mecanismo molecular que permite a los organismos anticiparse a los cambios en las condiciones ambientales que ocurren de manera periódica y predecible a lo largo del día y las estaciones. A nivel ecológico, este comportamiento anticipatorio permite que los distintos procesos fisiológicos ocurran en el momento más adecuado, optimizando así el aprovechamiento de los recursos disponibles. En plantas, al igual que en otros organismos, el reloj circadiano regula numerosos procesos fisiológicos, como es la defensa frente a patógenos, en la que es necesaria una caracterización más detallada sobre los mecanismos moleculares subyacentes.

En este contexto, el presente Trabajo Fin de Máster pretende profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales un componente clave del reloj, GIGANTEA (GI), regula la defensa frente a patógenos mediada por el ácido jasmónico (JA) y su posible interconexión con la ruta de señalización del etileno. Se piensa que esta regulación modularía la temporalización de las respuestas defensivas vegetales, contribuyendo a una mejor adaptación de la planta al ambiente. El marco de trabajo de este proyecto es relativamente novedoso, de manera que se han incorporado al estudio proteínas que recientemente han sido señaladas como potenciales piezas clave. Así, la hipótesis central de este proyecto es que GI regula negativamente a la familia de proteínas JAZ, las cuales intercomunican las rutas de señalización del JA y del etileno.

Palabras clave: reloj circadiano; GIGANTEA; ruta de señalización del ácido jasmónico (JA); ETHYLENE-INSENSITIVE 3 – LIKE1 (EIL1); patógenos.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El reloj circadiano

Los seres vivos disponen de unos mecanismos internos que les permiten ajustarse biológicamente a las fluctuaciones periódicas en las condiciones ambientales, las cuales se deben a la rotación diaria del planeta. Estos mecanismos internos son los relojes circadianos, que se encuentran en todos los dominios (Bacteria, Arquea y Eucariota) y guardan similitud a nivel estructural, aunque no a nivel de sus componentes individuales (Saini *et al.*, 2019).

La actividad del reloj circadiano es automantenida endógenamente y consiste en la transferencia e integración de las variaciones ambientales en los procesos fisiológicos. De esta manera, el reloj confiere un comportamiento anticipatorio, ya que coordina los procesos fisiológicos para que acontezcan en el momento más adecuado del día y del año. Desde el punto de vista ecológico, esto permite una eficiente distribución de los recursos metabólicos, traduciéndose en una mayor ventaja adaptativa. A su vez, el reloj tiene una característica conocida como *gating* o temporalización, lo cual quiere decir que sus respuestas a las señales ambientales varían según el estímulo y el momento del día (Greenham y McClung, 2015).

Respecto a la estructura del reloj circadiano, consta de un oscilador central que capta las señales ambientales o *inputs*, y las transfiere a redes genéticas de salida o *outputs* para regular procesos como el crecimiento, el metabolismo y las respuestas a estreses abióticos y bióticos. Las señales ambientales que principalmente percibe el reloj son la luz y la temperatura, y son las que lo sincronizan con el periodo externo de 24 horas (Figura 1). Ello se debe a que afectan a la transcripción y traducción de los componentes del oscilador central. Además, el mecanismo del reloj no es unidireccional, de manera que, mientras que las señales ambientales modulan al reloj, éste también modula su propia sensibilidad a dichas señales. Asimismo, las rutas de salida están interconectadas entre sí y también pueden regular la propia funcionalidad del reloj (Nohales y Kay, 2016).

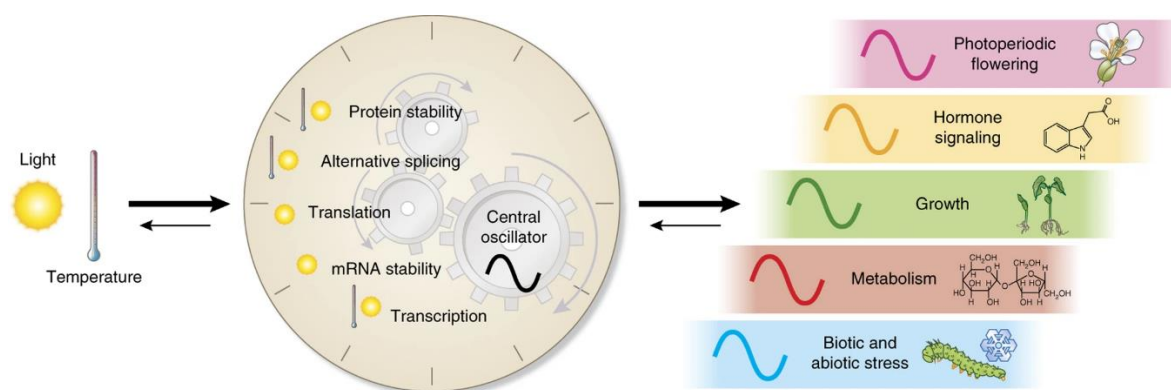


Figura 1. Esquema de la integración de las señales ambientales en el oscilador central vegetal. La luz y la temperatura modulan los procesos moleculares que afectan a los componentes del reloj (transcripción, estabilidad de RNAs mensajeros, traducción y estabilidad proteica, entre otros) para sincronizar al oscilador central y ajustar la temporalización de los procesos fisiológicos. Extraído de Nohales y Kay, 2016.

Como ya se ha comentado anteriormente, la luz y la temperatura son las principales señales ambientales que afectan al reloj. En cuanto a la luz, fundamentalmente influyen su calidad e intensidad. Además, hay una extensa regulación de sus rutas de señalización, por ejemplo, a través del control de la expresión de fotorreceptores, lo cual permite que el reloj module su sensibilidad a esta señal ambiental (Fankhauser y Staiger, 2002). En lo que respecta a la temperatura, el reloj tiene la

capacidad de amortiguar sutiles variaciones de este estímulo, de manera que puede mantener su ritmicidad relativamente constante ante ciertos rangos de temperatura (Gould *et al.*, 2006). También cabe destacar que la luz y la temperatura son señales que convergen en la regulación de los componentes del reloj, a través del *splicing alternativo* que inducen en algunos de sus genes (Nohales y Kay, 2016).

El reloj circadiano en el reino vegetal es una pieza clave, dada la naturaleza sésil de las plantas, ya que este mecanismo confiere una capacidad anticipatoria a las variaciones ambientales, como ya se ha comentado previamente (Greenham y McClung, 2015). Y en cuanto a su estructura, aunque la arquitectura del reloj sea similar entre los distintos reinos, el de las planta incluye una característica distintiva. Se trata de la prevalencia de elementos represores. De esta manera, la base molecular de los relojes circadianos vegetales consiste en bucles de retroalimentación transcripcionales y traduccionales (incluyen modificaciones post-transcripcionales y reciclado de proteínas) que mantienen la ritmicidad de la actividad fisiológica (Nohales y Kay, 2016).

1.2 Arquitectura molecular del reloj circadiano en el reino vegetal

El reloj circadiano ha sido extensamente estudiado en las plantas, entre otras razones, debido a su potencial aplicación en el campo de la mejora vegetal. Esto se debe a la enorme influencia que ejerce el reloj en los procesos fisiológicos. De hecho, estudios revelan que un alto porcentaje del transcriptoma de cultivos como arroz o soja está regulado por este mecanismo interno (Xu *et al.*, 2022).

El conocimiento sobre la arquitectura molecular del reloj procede, principalmente, del estudio de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Su oscilador central tiene un patrón de expresión que se ajusta al ciclo de 24 horas y, además, forma parte de bucles de retroalimentación negativos. Estos bucles están interconectados entre sí y se encuentran sujetos a regulación transcripcional, post-transcripcional, post-traducciona y epigenética (Greenham y McClung, 2015; Xu *et al.*, 2022).

Por lo general, los componentes del reloj se clasifican según su patrón de expresión a lo largo del ciclo de 24 horas (Xu *et al.*, 2022). Respecto a los genes de la mañana, los primeros descritos en *A. thaliana* fueron *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, dos factores de transcripción con un dominio tipo MYB cuyo pico de expresión ocurre al amanecer. CCA1 y LHY forman un complejo (CCA1/LHY) que reprime a los genes de la noche al unirse a un elemento regulador tipo *cis* localizado en los promotores de estos genes, denominado elemento del anochecer o *Evening Element (EE)* (Nohales y Kay, 2016). Esta función es de gran relevancia, dado que mutantes simples de pérdida de función para CCA1 y LHY muestran un acortamiento del ciclo, mientras que el doble mutante pasa a ser arrítmico, al igual que ocurre con la sobreexpresión de uno de ellos (Harmer *et al.*, 2000).

Uno de los genes de la noche que se ve reprimido por CCA1/LHY es *TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION 1)*, también conocido como *PRR1* ya que forma parte de la familia de las proteínas PRR (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR). A su vez, TOC1 actúa negativamente sobre la expresión de CCA1 y LHY, constituyendo un bucle de retroalimentación negativa (Liu *et al.*, 2022). Otras proteínas PRR (PRR9, PRR7 y PRR5) juegan un rol importante junto a TOC1 en la represión de la expresión de los genes CCA1/LHY a las horas más próximas al amanecer. Esto se consigue a través de la expresión secuencial de PRR9, PRR7, PRR5 y TOC1 a lo largo del día (Figura 2) (McClung, 2014).

Al atardecer, se expresa *GIGANTEA (GI)*, un gen altamente específico del reino vegetal cuya expresión es regulada negativamente durante la noche por TOC1, y durante el amanecer por el complejo CCA1/LHY, al que a su vez parece regular positivamente. Además, al igual que ocurre con otros componentes del reloj como las proteínas PRR, GI está implicada en la interfase entre el reloj y las

rutas *input* y *output* del mismo, de manera que es capaz de integrar señales ambientales (como luz y temperatura), así como afectar a procesos fisiológicos como el crecimiento o la floración (Nohales y Kay, 2016).

Posteriormente a *GI*, se activa el complejo del anochecer o *Evening Complex* (EC) compuesto por la asociación de tres proteínas: LUX ARRHYTHMO (LUX), EARLY FLOWERING 3 (ELF3) y ELF4 (Herrero *et al.*, 2012). El EC actúa como un represor transcripcional de *GI* y de los genes *PRR* y, a su vez, es reprimido al amanecer por CCA1/LHY y durante la noche por TOC1 (Nohales y Kay, 2016).

La arquitectura molecular del reloj es ciertamente compleja, sumándose a ella nuevos componentes conforme avanzan las investigaciones. Un buen ejemplo de ello son genes que actúan como activadores. Es el caso de los *LNKs* (*NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED*) y *RVE8* (*REVEILLE 8*) durante el atardecer y de los *LWDs* (*LIGHT-REGULATED WD*) desde la mañana y parte del atardecer, como muestra la figura 2.

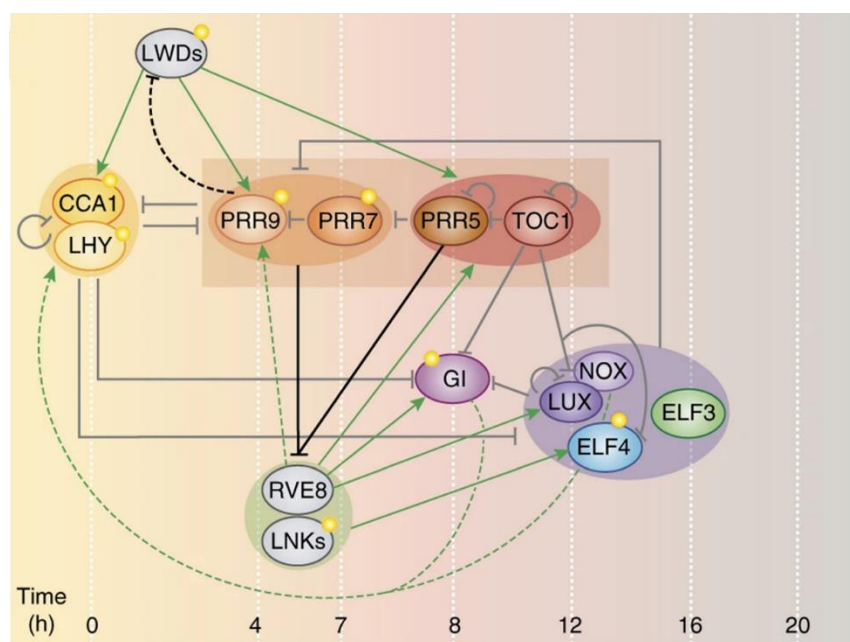


Figura 2. Esquema de la arquitectura molecular del reloj. Las flechas verdes y barras negras representan la activación y represión de componentes del reloj, respectivamente. El momento del día en el que se expresan los distintos genes se indica en horas (h) y los genes cuya expresión responde a luz aparecen marcados con un símbolo de sol. Los grupos génicos funcionales están representados mediante óvalos. En el grupo funcional del EC se incluye la proteína NOX, similar a LUX, aunque no redundante. Adaptado de Nohales y Kay, 2016.

1.3 Regulación temporal de la defensa frente al estrés biótico

Según la denominada *teoría de la defensa óptima*, las rutas de defensa frente al estrés biótico no son constitutivas con el fin de no suponer un coste de recursos demasiado elevado y evitar así ocasionar una menor ventaja adaptativa o *fitness*. Hasta hace unos años, se pensaba que, para conseguirlo, una de las estrategias adoptadas por las plantas consistía en mantener niveles basales de activación de estas rutas en los tejidos más relevantes y vulnerables frente a la amenaza biótica, tales como las estructuras reproductivas (Meldau y Baldwin, 2012). Sin embargo, más recientemente, se ha descrito que la función del reloj circadiano también es de vital importancia para conseguir una defensa óptima, dado que la información temporal que transmite permite que la activación basal e inducción de las rutas de defensa acontezca en el momento del día y del año más propicio: el que coincide con el ataque de patógenos y herbívoros (Greenham y McClung, 2015). De hecho, un buen ejemplo de ello está relacionado con la apertura estomáca. Este proceso fisiológico tiene una regulación circadiana que

lo hace acontecer en las primeras horas del día, marcando este momento como uno de los más vulnerables para la planta frente a patógenos que puedan penetrar a su interior a través de estas aperturas. A su vez, esto es contrarrestado por el propio reloj, ya que maximiza las defensas en ese momento del día (Zhang *et al.*, 2013).

Múltiples investigaciones sustentan la influencia circadiana en el estrés biótico, como es la oscilación temporal en *A. thaliana* de la expresión de *PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROL 1 (PCC1)*, un gen inducible por la infección de *Pseudomonas syringae* que presenta su pico de expresión al atardecer (Sauerbrunn y Schlaich, 2004). Por otro lado, estudios de genética reversa señalan que las respuestas defensivas se ven perjudicadas en mutantes asíncronos del reloj (de Leone *et al.*, 2020).

La interconexión entre el reloj circadiano, el estrés biótico y, por lo tanto, el sistema inmune vegetal también implica a las fitohormonas. Las hormonas que participan en la inmunidad vegetal son el ácido salicílico (SA), comúnmente inducido por patógenos biótrofos, y el ácido jasmónico (JA), que actúa frente a herbívoros y frente a necrófitos junto con el etileno (Huot *et al.*, 2014). Estas rutas operan en múltiples redes moleculares y se encuentran fuertemente intercomunicadas entre sí, lo que se conoce como *crossstalk*. Concretamente, la interacción entre estas rutas es antagónica y esta interconexión permite que las plantas puedan ajustar su respuesta ante simultáneos estreses bióticos (Ingle *et al.*, 2015). Por ejemplo, el reloj circadiano modula las rutas biosintéticas y de señalización del SA y el JA, de manera que el pico de SA ocurre por la noche y el de JA a medio día, coincidiendo en cada caso con los picos de infección de los patógenos frente a los que actúan (Zhang y Wang, 2019). Por ejemplo, el pico de acumulación de JA coincide con el momento del día en el que se reportan mayores ataques de la oruga *Trichopulsia ni*. Goodspeed y colaboradores mostraron cómo la asincronización del reloj de plantas de *A. thaliana* provoca la imposibilidad de inducir la ruta del JA durante el día, ocasionando una mayor susceptibilidad frente a las orugas (figura 3) (Goodspeed *et al.*, 2012).

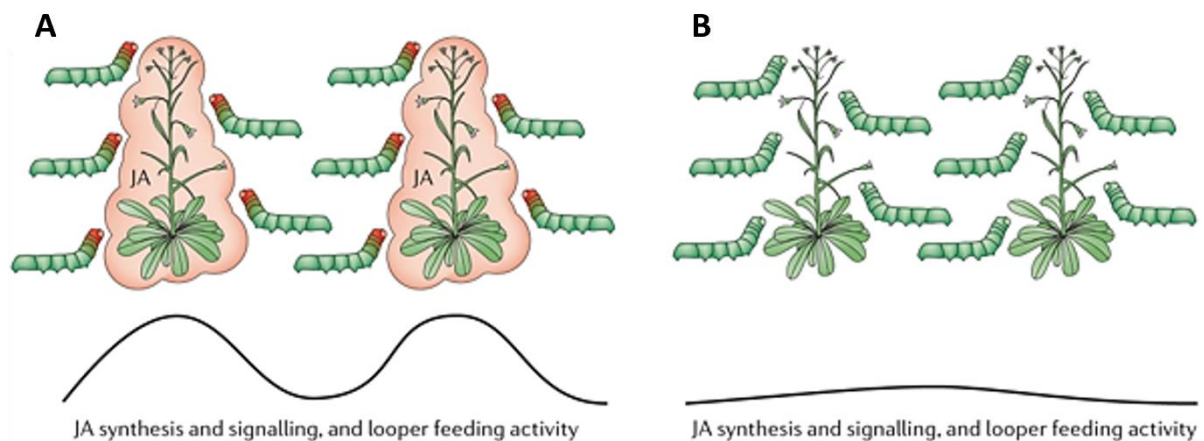


Figura 3. Regulación circadiana de la ruta biosintética y de señalización del ácido jasmónico. A. El reloj circadiano promueve que el pico de acumulación de JA ocurra a medio día coincidiendo con el momento en el que las orugas se alimentan de las plantas, confiriéndoles resistencia. B. La asincronía del reloj de las plantas ocasiona que la ruta del JA y el ataque de las orugas no estén sincronizados (estén fuera de fase), de manera que no se produce pico de acumulación de JA en el momento adecuado y aumenta la susceptibilidad de las plantas. Adaptado de Greenham y McClung, 2015.

Respecto a la regulación circadiana del SA, se ha descrito que *CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE)*, un componente del reloj, es un activador de *ICS1 (ISOCHORISMATE SYNTHASE 1)*, que codifica la enzima central de la biosíntesis de esta hormona. De hecho, el patrón de expresión temporal de ambos genes es similar (Zhang y Wang, 2019).

La regulación circadiana de la inmunidad vegetal es muy compleja, entre otros motivos debido a que la relación entre ambos mecanismos no es unidireccional (de Leone *et al.*, 2020). Las implicaciones de esta interconexión serán evaluadas en posteriores apartados.

1.4 Ruta de señalización del ácido jasmónico

Los jasmonatos conforman un grupo de fitohormonas de composición lipídica. Los pasos iniciales de su biosíntesis ocurren entre los cloroplastos y los peroxisomas a partir de la ruta octadecanoica, que parte del α -linolénico. En el citoplasma tienen lugar los pasos finales en los que el ácido jasmónico es conjugado con isoleucina y experimenta modificaciones químicas hasta la formación de la especie bioactiva ((trans)7-iso-JA-Ile), comúnmente conocida como ácido jasmónico o JA. A nivel funcional, además de actuar en la respuesta defensiva frente a necrótrofos y herbívoros, también participa en otros procesos fisiológicos relacionados con el desarrollo y el estrés, como es la elongación radicular, el crecimiento reproductivo o el estrés abiótico (Huang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

En la señalización del JA intervienen tres componentes proteicos esenciales: un receptor de JA, un represor de los factores de transcripción (TFs) de respuesta a JA, que actúa en ausencia de JA, y genes de respuesta a JA, que son activados por dichos TFs. CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) es el receptor de la ruta. Se trata de una proteína F-box que forma parte del complejo SCF (SKIP-CULLIN-F-box), que a su vez actúa como una ubiquitina E3 ligasa que permite la degradación de proteínas vía el proteosoma 26S. Por otro lado, las proteínas JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ) son los represores de la señalización por JA. En *A. thaliana* se han identificado hasta 13 proteínas JAZ y cada una presenta dos dominios conservados: un dominio ZIM que permite la dimerización de la proteína y un dominio Jas que permite la interacción de la proteína con el receptor COI1 y con otros factores de transcripción, los cuales constituyen las dianas de las proteínas JAZ. Entre las principales dianas de los JAZs destaca MYC, una familia de factores de transcripción tipo bHLH. MYC2 es la proteína principalmente implicada, aunque también cabe destacar a MYC3 y MYC4 (Zhang *et al.*, 2019).

Concretamente, la ruta de señalización por JA opera de la siguiente manera. En presencia de JA, la percepción de esta hormona por COI1 permite que se forme el complejo COI1-JA-JAZ, lo cual promueve la ubiquitinación y posterior degradación de JAZ por la vía del proteosoma 26S. Como consecuencia, ante la ausencia del represor JAZ, MYC2 puede activar la expresión de genes de respuesta a JA. Sin embargo, en ausencia de JA, JAZ no es ubiquitinado ni degradado, llevando a cabo su acción: reprimir a MYC2 y, por ende, la transcripción de los genes de respuesta a JA (figura 4) (Nguyen *et al.*, 2022).

En el apartado anterior se comentó la regulación temporal que presenta el JA. Shin y colaboradores demostraron esto a través de la contribución de TIME FOR COFFEE (TIC), un componente del reloj que inhibe la expresión de *COI1* y de *MYC2*, consiguiendo así una regulación circadiana de las respuestas a JA (Shin *et al.*, 2012). Por otro lado, recientemente, se ha descrito que el JA también ejerce un efecto regulatorio sobre el reloj circadiano. Ello se ha visto a través de la regulación negativa que ejerce el JA sobre la expresión de *CCA1* y de *LUX*, uno de los componentes del complejo del anochecer del reloj (Zhang *et al.*, 2019).

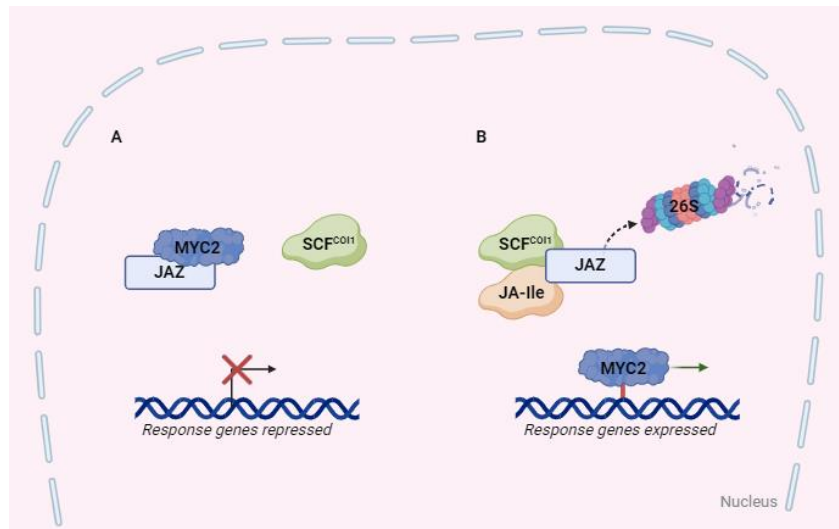


Figura 4. Ruta de señalización del ácido jasmónico. **A.** En ausencia de JA, las proteínas JAZ no son degradadas y reprimen la acción de MYC2, reprimiendo así la expresión de genes de respuesta a JA. **B.** En presencia de JA, se forma el complejo COI1-JA-JAZ que lleva a la degradación de JAZ, permitiendo así que MYC2 active la transcripción de genes de respuesta a JA. Adaptado de Staswick, 2008.

1.5 Convergencia entre las rutas del etileno y del jasmónico

Como se ha comentado en el apartado anterior, las rutas del JA y del etileno se activan ante infección por patógenos necrótrofos. Sin embargo, la actuación de estas hormonas no es paralela, sino que existe un *crossstalk* entre ellas, dado que durante el ataque de necrótrofos las rutas de señalización del JA y del etileno operan sinérgicamente para activar genes de defensa como *PLANT DEFENSIN1.2* (*PDF1.2*) (Zarei *et al.*, 2011).

De forma simplificada, la señalización por etileno consiste en la regulación negativa que ejerce esta molécula sobre sus receptores (ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1), ETR2 (ETHYLENE RESPONSE 2), EIN4 (ETHYLENE-INSENSITIVE 4), ERS2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 2)). Ello implica que no se active el regulador negativo de la ruta, CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1). A su vez, la falta de función de CTR1 conlleva la translocación de EIN2 (ETHYLENE-INSENSITIVE 2) al núcleo, donde estabiliza a los reguladores transcripcionales (EIN3 (ETHYLENE-INSENSITIVE 3), EIL1 (ETHYLENE-INSENSITIVE 3-LIKE 1), EIL2 (ETHYLENE-INSENSITIVE 3-LIKE 2)) que activan a factores de transcripción de la familia AP2/ERF (APETALA2/ETHYLENE-RESPONSIVE FACTOR), como ORA59 (ETHYLENE RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR ORA59) o los ERFs, que a su vez activan a los genes de respuesta al etileno. Por otro lado, en ausencia de etileno, sus receptores mantienen su activación constitutiva y permiten que CTR1 esté activo e inhiba la translocación de EIN2 al núcleo. Con lo cual, los reguladores transcripcionales EIN3, EIL1 y EIL2 son degradados por el proteosoma vía 26S, inhibiendo la respuesta a etileno (Figura 5A) (Binder, 2020).

El *crossstalk* entre el JA y el etileno ocurre a nivel de la represión que ejercen las proteínas JAZ, cuya regulación negativa afecta, además de a MYC2, a los reguladores transcripcionales EIN3 y EIL1 a través de interacción física (figura 5B). De esta manera, en presencia de JA y etileno, el JA promueve la degradación de las proteínas JAZ, permitiendo la actividad de MYC2, EIN3 y EIL1. Por su lado, MYC2 regula positivamente la expresión de genes de respuesta a JA que fomentarán una mayor resistencia de la planta. Y, por otro lado, la actividad de EIN3 y EIL1 resultará en la expresión de *ORA59* y los *ERFs*, los cuales activarán a genes de respuesta al etileno, como *PDF1.2*, que promueve resistencia (Liu y Timko, 2021).

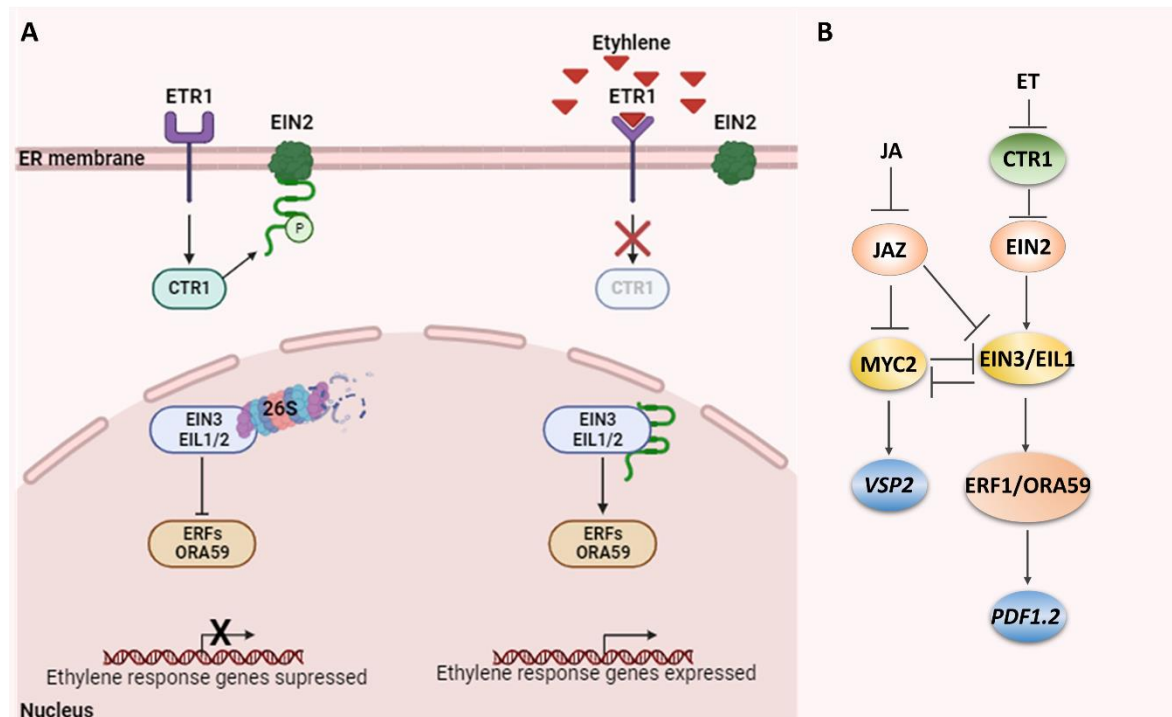


Figura 5. Señalización por etileno y convergencia con JA. A. En presencia de etileno, CTR1 se mantiene inactivo, de manera que no fosforila al extremo C-terminal de EIN2, permitiendo la escisión de este extremo que se transloca hacia el núcleo donde estabiliza a EIN3, EIL1 y EIL2. Esto promueve que los reguladores transcripcionales ERF y ORA59 puedan activar la expresión de genes de respuesta al etileno. En ausencia de etileno (izquierda), el extremo C-terminal de EIN2 es fosforilado por CTR1, por lo que no ocurre la escisión y EIN3, EIL1 y EIL2 son degradados vía proteosoma 26S. Adaptado de Liu y Timko, 2021 **B.** *Crosstalk* entre las rutas del JA y el etileno: la presencia de JA evita la represión de MYC2, EIN3 y EIL1 por parte de JAZ, permitiendo la expresión de genes que promueven la resistencia, como VSP2 y PDF1.2. MYC2 y EIN3/EIL1 pueden interactuar físicamente y autorreprimirse, aunque todavía falta investigación al respecto. Adaptado de Ji y Guo, 2013.

1.6 GIGANTEA como componente *hub* del reloj circadiano

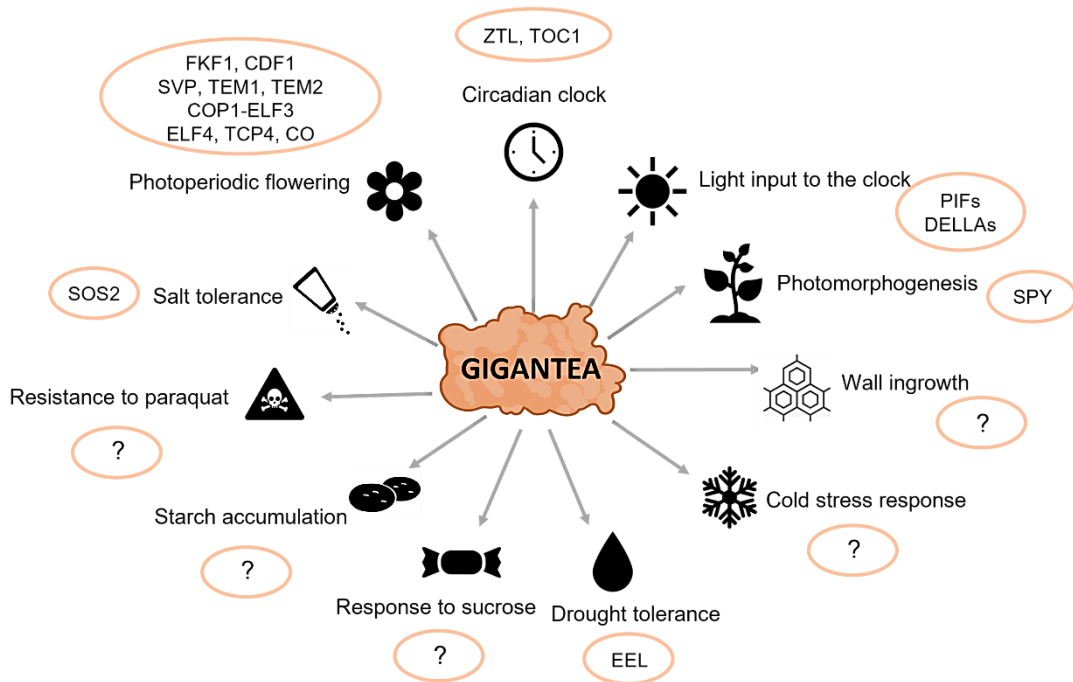
GIGANTEA es un gen conservado en el reino vegetal que fue identificado en un mutante de floración tardía de *A. thaliana* (mutante de pérdida de función; *gi*) (Rédei, 1962; Mishra y Panigrahi, 2015). Es específico de plantas y se encuentra en una sola copia en la mayoría de las especies, aunque en *Solanáceas* se ha reportado duplicación génica. A nivel genómico, el locus *G1* de *A. thaliana* consta de 14 exones y codifica una proteína nuclear-citoplasmática de 1173 aminoácidos y 127 kDa con una estructura que carece de dominios conservados. Además, su expresión es ubicua a nivel de tejido y fase de desarrollo. Esto último está en concordancia con su importante implicación a nivel fisiológico, ya que aun faltando estudios que caractericen su función, se conoce que tiene un relevante papel en múltiples procesos tales como el reloj circadiano, la señalización hormonal y por luz, o el tiempo de floración, así como el desarrollo de tolerancia a estrés salino (Brandoli *et al.*, 2020; Patnaik *et al.*, 2023). Por otro lado, su acumulación presenta una regulación circadiana, cuyo patrón es similar tanto para el transcrito como para la proteína de *G1*. Concretamente, su pico máximo de expresión ocurre al principio de la noche bajo condiciones de día corto, y unas horas más tarde en el caso de día largo (Mishra y Panigrahi, 2015).

En lo que respecta a la señalización por luz, *G1* afecta a la actividad de las proteínas PIF, una familia de factores de transcripción tipo bHLH que actúan como reguladores negativos de la fotomorfogénesis bajo condiciones de luz roja lejana y oscuridad (Xu *et al.*, 2015; Nohales *et al.*, 2019). Concretamente, *G1* afecta a la transcripción de *PIF*, así como a la actividad de su proteína, dado que promueve su

degradación y su acceso a las regiones promotoras de genes diana (Nohales *et al.*, 2019). En cuanto al tiempo de floración, GI activa la expresión de los reguladores florales más relevantes, *CONSTANS* (*CO*) y *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), bajo condiciones de día largo en *A. thaliana*. Esto solo ocurre en día largo porque es cuando el pico de acumulación de GI ocurre en el momento idóneo para que pueda reprimir a *CYCLING DOF FACTOR 1* (*CDF1*), represor de *CO*, permitiendo así la acumulación de *CO*, que a su vez activa a *FT*, que promueve la floración (Brandoli *et al.*, 2020). Respecto a la tolerancia a estrés salino que fomenta GI, ocurre a través de su interacción con la ruta SOS, de manera que, ante niveles elevados de sal, GI permite el flujo de iones sodio hacia el exterior celular (Park *et al.*, 2016).

Además de en la regulación circadiana de la señalización por luz, la floración o el estrés salino, GI participa en una infinidad de procesos relacionados con el crecimiento, la senescencia, el metabolismo e incluso el estrés biótico (Brandoli *et al.*, 2020; Patnaik *et al.*, 2023). Se considera así que GI funciona como nexo (o *hub*) entre el reloj circadiano y los procesos fisiológicos regulados por éste (conocido como *output* del reloj) (figura 6A; 6B). Aunque se desconoce su función bioquímica, la evidencia disponible sugiere que GI realizaría esta función a través de la regulación de la actividad de distintas proteínas, actuando bien como regulador transcripcional o como co-chaperona (Cha *et al.*, 2017; Nohales *et al.*, 2019).

A.



B.

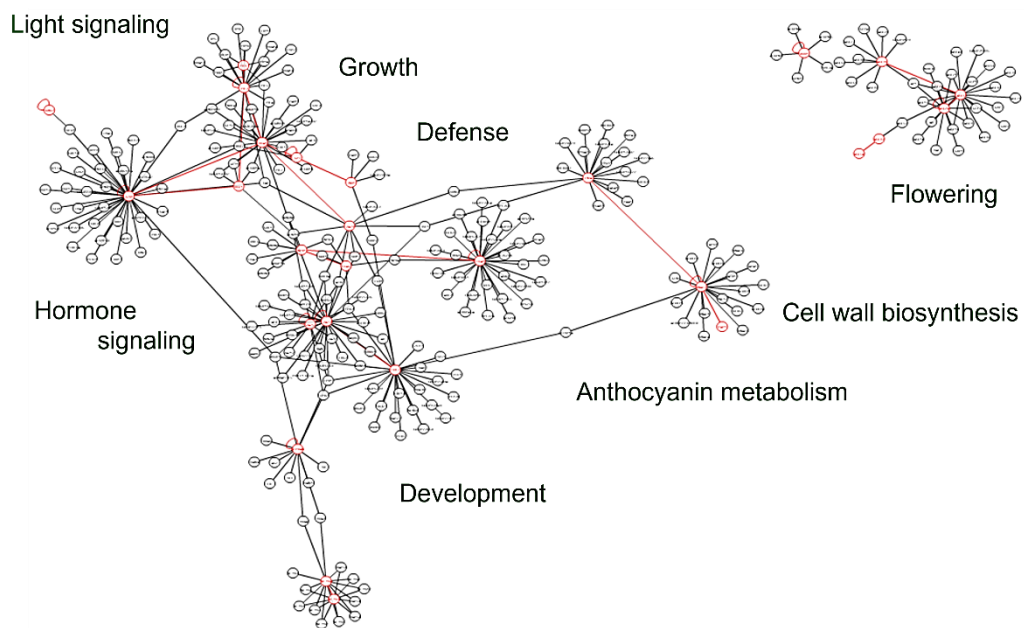


Figura 6. Actividad de GI en los procesos fisiológicos. A. GI interactúa con factores de transcripción de múltiples ruta moleculares, y para la mayoría de ellas se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes. **B.** GI regula ininidad de procesos fisiológicos.

1.7 Antecedentes e hipótesis

En apartados anteriores se ha referenciado la temporalización existente en la ruta de señalización del JA a través del reloj circadiano, así como la conexión de esta ruta hormonal con la del etileno (Shin *et al.*, 2012; Liu y Timko, 2021). Teniendo en cuenta el papel del JA y del etileno en el estrés biótico, junto con el comportamiento anticipatorio que confiere el reloj circadiano (Greenham y McClung, 2015), la interconexión entre estos procesos es muy interesante. Hasta hace relativamente poco el componente anticipatorio del reloj se conocía solo respecto a estímulos abióticos. Sin embargo, recientemente se han iniciado investigaciones que tratan de profundizar en el potencial *crosstalk* entre el reloj circadiano y los procesos defensivos, a través de hormonas como el JA. Un estudio reveló variación temporal en la resistencia de *A. thaliana* frente al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea* en función del momento de inoculación, siendo mayor la resistencia en inoculaciones al amanecer. Concretamente, llegaron a la conclusión de que esta variación se debe a la acción del reloj y, más específicamente, a la acción del reloj sobre las rutas de señalización del JA y etileno. De hecho, comprobaron que la variación en la susceptibilidad desaparece en mutantes del reloj, así como en mutantes de las rutas del JA y del etileno (Ingle *et al.*, 2015).

En este contexto, estudios previos llevados a cabo en el laboratorio en el que se desarrolló el presente Trabajo Fin de Máster señalan a la función de GI como un potencial punto de intercomunicación entre el reloj circadiano y la defensa mediada por JA a través de la regulación de las proteínas JAZ, que como se ha mencionado anteriormente conectan la ruta del JA con la del etileno (Liu y Timko, 2021). Ensayos de doble híbrido en levadura (Y2H) han revelado la interacción *in vitro* entre GI y varias proteínas JAZ de *A. thaliana*, como JAZ3, JAZ5, JAZ9 y JAZ10. Además, se ha comprobado que en el mutante de pérdida de función *gi-2* los genes de respuesta a JA se encuentran reprimidos, represión que puede ser restituida al mutar varias proteínas JAZ (debido a su efecto redundante).

Teniendo en cuenta los datos de la literatura y del laboratorio en el que se ha llevado a cabo este proyecto, se plantea una hipótesis de trabajo que consiste en que GIGANTEA regula negativamente a las proteínas JAZ durante la noche, permitiendo que durante la mañana las rutas del ácido jasmónico y del etileno funcionen adecuadamente promoviendo la expresión de genes de defensa al estrés biótico (figura 7A). En el marco de esta hipótesis, los componentes clave de estudio son las proteínas JAZ, MYC2 y EIN3/EIL1, para cuya función se establecerá la relevancia de la regulación mediada por GI. Se continuará por tanto la investigación iniciada en anteriores proyectos respecto a la función de MYC2, incluyendo en este caso al módulo EIN3/EIL1 con el fin de considerar las principales rutas hormonales (JA y etileno) implicadas en la defensa frente a necrótrofos. En relación con las proteínas JAZ, este trabajo ampliará su investigación para incluir a JAZ6, que, aunque no había sido identificado como interactante de GI en el rastreo inicial por doble híbrido en levadura, parece tener una especial relevancia en la temporalización de la susceptibilidad frente a *B. cinerea*, como mostraron Ingle y colaboradores (figura 7B) (Ingle *et al.*, 2015).

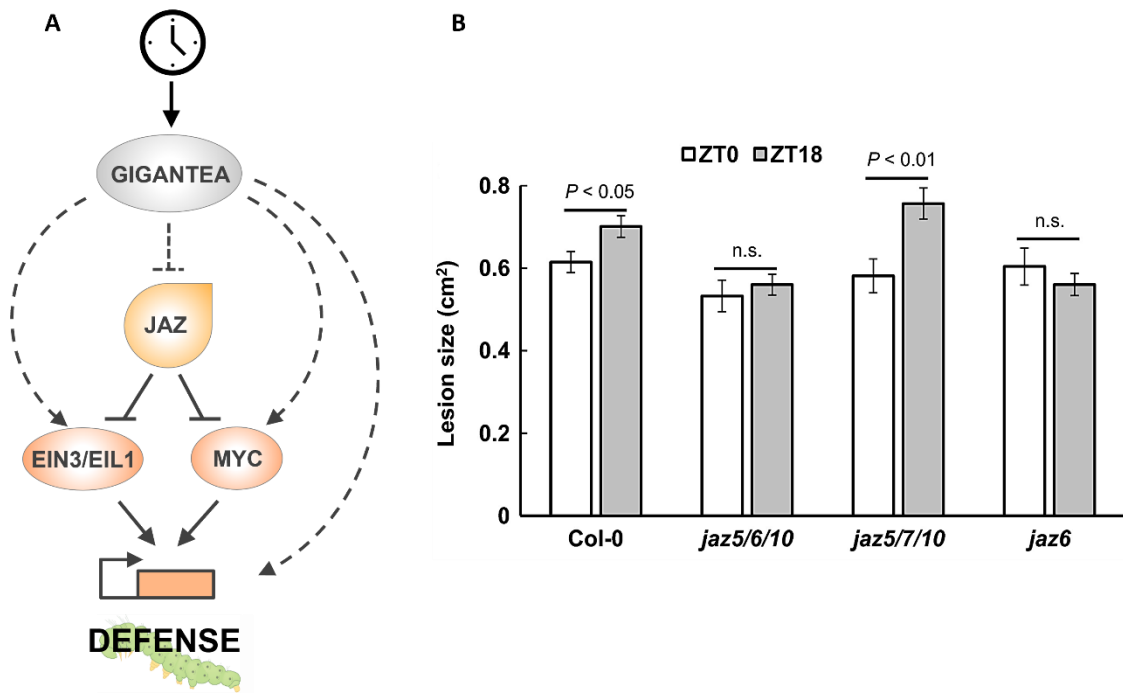


Figura 7. Esquema de la hipótesis e investigaciones previas. A. Las líneas continuas representan interacciones validadas experimentalmente. Las líneas discontinuas representan las interacciones que conforman la hipótesis y que deberán ser testadas. B. El gráfico representa el tamaño de la lesión generado por *B. cinerea* en distintos genotipos. Las barras blancas y grises indican el tamaño de lesión producido por inoculaciones con *B. cinerea* al amanecer (ZT0) o al anochecer (ZT18), respectivamente, en día largo. Extraído de Ingle et al., 2015.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

A continuación, se plantean los objetivos de este Trabajo Fin de Máster:

- Valorar la posible implicación de GI en la ruta de señalización por etileno.
- Evaluar la conexión entre el reloj circadiano y las rutas de señalización del ácido jasmónico y del etileno en el contexto de la defensa frente a patógenos necrótrofos. Para ello, se plantea el estudio de la posible interacción molecular entre GI y JAZ6, y GI y EIL1.
- Contribuir a la caracterización mecanística de las potenciales interacciones entre GI, las proteínas JAZs y los factores de transcripción EIN3/EIL1 y MYC2, controlados por los JAZ.
- Comprobar la participación de GI en la activación de las respuestas defensivas frente a patógenos necrótrofos.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

En este Trabajo Fin de Máster se han utilizado líneas de *Arabidopsis thaliana* de los ecotipos Columbia 0 (Col-0), *gi-2* (Fowler *et al.*, 1999) y *Gl Ox*, que son mutantes de pérdida y de ganancia de función de *Gl*, respectivamente.

Respecto al resto de líneas, se obtuvieron fijando en homocigosis los triples mutantes *gi-2;jaz3-1;jaz10-1* y *gi-2;jaz5-1;jaz10-1*, los cuales fueron previamente generados en nuestro laboratorio a partir de cruces con los mutantes simples, provenientes del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). También se llevó a cabo la generación del mutante homocigoto *eil1-3* a partir de la línea SALK_049679C obtenida en el NASC (Binder *et al.*, 2007). De forma abreviada, este trabajo se referirá al ecotipo *eil1-3* como *eil1*.

3.2 Genotipado de las líneas mutantes

Las líneas genotipadas fueron los mutantes *gi-2;jaz3-1;jaz10-1*, *gi-2;jaz5-1;jaz10-1* y *eil1*, con el objetivo de seleccionar individuos homocigotos y generar a partir de ellos la correspondiente línea fijada. Para ello, inicialmente se llevó a cabo el método de extracción de DNA descrito por Edwards y colaboradores (Edwards *et al.*, 1991), según el cual a partir de una hoja de cada planta se consigue una extracción sencilla y de alto rendimiento. Todos los mutantes genotipados son insercionales de T-DNA, por lo que, una vez extraído el DNA genómico y para detectar la presencia en homocigosis del inserto, se realizaron PCRs de genotipado con los cebadores que se muestran en la tabla 1.

Propósito	Secuencia
<i>gi-2</i> , genotipado, directo	CTAACATGTTCACTATCCTAACAG
<i>gi-2</i> , genotipado, reverso	GTCGAGAACCACTAGTTGTAGC
<i>jaz3-1</i> , genotipado, directo	ATGGGCTACAACACAAAATGG
<i>jaz3-1</i> , genotipado, reverso	GTGCTCTGTCGATTCTTCAG
<i>jaz5-1</i> , genotipado, directo	ACGTTCCACGATCTGATTTTG
<i>jaz5-1</i> , genotipado, reverso	GTACTCTCCATTTTACGCGC
<i>jaz10-1</i> , genotipado, directo	CTTCTCGAGAAAACGTTGCAG
<i>jaz10-1</i> , genotipado, reverso	TCACATGAGAAATCAGAATCCG
<i>eil1</i> , genotipado, directo	GCTCCATACGCTAAACGATTG
<i>eil1</i> , genotipado, reverso	ACAAAATGCGTTTGAAACGTC
SALK cebador común para LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

Tabla 1. Listado de cebadores para el genotipado de los mutantes insercionales de T-DNA.

3.3 Esterilización de semillas y crecimiento *in vitro* de plántulas

Una vez seleccionados los individuos homocigotos de cada línea, se sembraron sus semillas para su posterior uso en los ensayos pertinentes. Para ello, se llevó a cabo un protocolo de esterilización consistente en un lavado inicial de las semillas con una solución de etanol (70%) y Tritón X-100 (0.1%) durante 5-10 minutos en agitación, seguido de otro lavado de 2 a 5 minutos con etanol (96%). Tras retirar el etanol 96%, las semillas se dejaron secar en papeles de filtro desde los que fueron plaqueadas en medio 0.5x MS (Murashige y Skoog), donde se incubaron durante 3 días a 4°C en oscuridad para inducir la estratificación.

3.4 Medidas de la sensibilidad fisiológica al ACC

Para la evaluación fisiológica de la sensibilidad al etileno se llevó a cabo un ensayo en el que se midió la triple respuesta a esta hormona. La triple respuesta al etileno conlleva un conjunto de cambios fisiológicos motivados por elevadas concentraciones de etileno que implican un acortamiento del hipocotilo y de la raíz, junto con la formación del gancho apical a través de una curvatura exagerada (Dugardeyn y Van Der Straeten, 2008). Además, estos cambios son más fácilmente cuantificables bajo condiciones de etiolación. Por ello, se midió la longitud del hipocotilo y de la raíz, y el ángulo de curvatura del gancho apical de plántulas en condiciones de etiolación.

Las líneas utilizadas en este ensayo fueron *gi-2*, *Gl ox* y, como controles, se utilizaron los ecotipos Col-0, cuya respuesta al etileno no se encuentra afectada, y *eil1* que, al tener pérdida de función de *EIL1*, tiene una menor respuesta a esta hormona.

Respecto a las condiciones de cultivo, se sembraron 30 semillas de cada línea testada, previamente estratificadas en agua durante 4 días, bajo dos condiciones, una de ellas en placas con medio control 0.5x MS y la otra en placas con medio 0.5x MS suplementado con 10 μ M de ACC, que es un precursor del etileno. Las semillas se mantuvieron durante 8 horas en luz blanca continua para promover la germinación. Posteriormente, las placas se taparon durante 3 días para inducir la etiolación y se mantuvieron orientadas verticalmente para conseguir un crecimiento horizontal de las plántulas y permitir una recogida de las medidas sencilla y fiable. Además, durante todo el proceso de crecimiento, las placas sin ACC se mantuvieron separadas de las suplementadas con ACC, para evitar que el etileno generado por las plántulas de estas últimas placas afectase al crecimiento de las plántulas control sin ACC.

La recogida de las medidas se hizo a través de la toma de imágenes de cada placa en el instante en que se destaparon pasados los 3 días, para evitar que se perdiera el efecto del gancho apical. Seguidamente, las imágenes fueron analizadas con el software Fiji del NIH ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>) para tomar las medidas de longitud de los hipocotilos y raíces, así como de los ángulos de curvatura de los ganchos apicales. Para este último parámetro, se midió el ángulo formado entre el gancho apical y el eje del hipocotilo, como se puede observar en la figura 8, capturada desde el software Fiji. Estas medidas están basadas en el protocolo definido por Vandenbussche y colaboradores (Vandenbussche *et al.*, 2010).

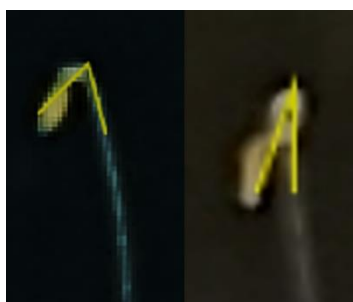


Figura 8. Medida del ángulo de curvatura del gancho apical con Fiji. Ángulo de un gancho curvado (izquierda) y de un gancho exagerado (derecha).

3.5 Análisis estadístico y bioinformático

Los análisis estadísticos, así como las gráficas representadas en este Trabajo Fin de Máster, fueron realizados a través de Excel y GraphPad Prism 10 (<https://www.graphpad.com/>). La significancia estadística se determinó a través del análisis de la varianza (ANOVA) de un solo factor seguido del test de Tukey, para así hacer comparaciones múltiples entre medias y establecer grupos estadísticamente significativos. Se utilizó un p-valor ≤ 0.05 para establecer diferencias estadísticamente significativas.

La representación de los genes compartidos entre los diferentes sets de datos utilizados en el metanálisis se hizo a través del paquete BioVenn (Hulsen *et al.*, 2008). Para evaluar la significancia estadística de la intersección de los diagramas de Venn se utilizó un test hipergeométrico.

3.6 Generación de construcciones para los análisis de interacción *in vitro*

Para las co-inmunoprecipitaciones *in vitro* y el ensayo de doble híbrido en levadura, fueron generadas las construcciones necesarias mediante la tecnología Gateway de Invitrogen, según la cual los cDNAs de los loci se transfieren desde vectores pDONR207 hasta vectores destino. Concretamente, para llevar a cabo las co-inmunoprecipitaciones basadas en el sistema de expresión *in vitro* TNT, se utilizaron dos tipos de vector pTNT, uno de ellos con la etiqueta FLAG (pTNTFLAG) y otro con la etiqueta HA (pTNTHA). Y, respecto a las construcciones generadas, los cDNAs de *JAZ6*, *EIL1* y *GI* fueron transferidos a todos estos vectores, el de GFP a pTNTFLAG y ya se disponía en el laboratorio de la construcción pTNTFLAG::MYC2. En el caso del ensayo de doble híbrido, puesto que se utilizó el sistema CLONTECH®, se utilizaron los vectores pGADT7 y pGBKT7 para generar las construcciones pGADT7::JAZ6, pGADT7::EIL1 y pGBKT7::GI. Para ambos ensayos, ya se disponía en el laboratorio de los controles negativos (pTNTFLAG y pGADT7 vacíos), por lo que tan solo fue necesario refrescar estos vectores mediante transformación de *Escherichia coli* y posterior cultivo y purificación de DNA plasmídico, con el objetivo de amplificarlos.

En el caso de las construcciones de *EIL1*, *GI* y *GFP*, sus secuencias de cDNA ya se encontraban clonadas en vectores pDONR207. Sin embargo, en el caso de *JAZ6* no. Por ello, en primer lugar, se diseñó una pareja de cebadores para amplificar el cDNA y añadirle las colas *attB1* y *attB2* a los extremos 5' y 3', respectivamente, necesarias para la posterior reacción de Gateway. La pareja de cebadores diseñada se indica en la tabla 2. Así, el cDNA amplificado fue clonado en un vector pDONR207 mediante la reacción de recombinación BP de Gateway y comprobado tras posterior secuenciación. Seguidamente, el cDNA se transfirió desde el pDONR207 al correspondiente vector destino mediante la reacción de recombinación LR.

Propósito	Secuencia
Amplificar cDNA de JAZ6 y clonar en pDONR207, directo	<i>attB1</i> ATGTCAACGGGACAAGCG
Amplificar cDNA de JAZ6+STOP y clonar en pDONR207, reverso	<i>attB2</i> CTAAGCTTGAGTTCAAGGT
JAZ6+STOP en pDONR207, directo	ATGTCAACGGGACAAGCG
JAZ6+STOP en pDONR207, reverso	CTAAGCTTGAGTTCAAGGT

Tabla 2. Diseño de cebadores para la generación de construcciones y secuenciación de pDONR207::JAZ6

Asimismo, respecto a las construcciones de *EIL1*, *GI* y *GFP* ya clonadas en el vector pDONR207, también fueron transferidas mediante una reacción de recombinación LR a los correspondientes vectores destino.

3.7 Ensayo de doble híbrido en levadura

En primer lugar, las construcciones previamente generadas mediante Gateway para el ensayo de doble híbrido fueron co-transformadas en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AH109, en base al protocolo "Lazybones". Las parejas de construcciones co-transformadas fueron las siguientes: pGBKT7::GI/ pGADT7::JAZ6, pGBKT7::GI/ pGADT7::EIL1, pGBKT7::GI/ pGADT7 vacío. Para cada co-transformación se utilizaron 1,5 µg de cada uno de los vectores, junto con 5 µL de 1% de ssDNA, previamente desnaturalizado, y agua miliQ estéril hasta un volumen final de 50 µL. Posteriormente, cada co-transformación fue inoculada con una cantidad de levadura equiparable al anillo de un asa de siembra y proveniente de un cultivo que no superase las 48 h de crecimiento. Asimismo, se añadieron 0.5 mL de la denominada solución PLATE para permitir la agregación y la co-transformación de las células. Dicha solución contiene 40% de PEG 4000, 100 mM de acetato de litio, 10 mM de Tris (pH 7.5) y 0.4 mM de EDTA.

Cada una de las co-transformaciones fue incubada durante una noche a temperatura ambiente y, al día siguiente, tras otro periodo de incubación de 15 minutos a 42°C, las levaduras fueron recuperadas mediante centrifugación y cultivadas en medios de selección. El medio de selección empleado fue SD sin leucina y sin triptófano (-Leu, -Trp), ya que los vectores con los que las levaduras fueron co-transformadas permiten la síntesis de dichos aminoácidos. Las placas de SD -Leu -Trp se dejaron crecer de 2 a 3 días a 28°C, después de lo cual 3 colonias independientes de cada co-transformación fueron disueltas en 100 µL de agua y goteadas en una nueva placa con el mismo medio de selección. El objetivo de esto último es el de normalizar la concentración de células de levadura de cada colonia. Así, tras 2 días de crecimiento a 28°C y para analizar la interacción, cada colonia de cada co-transformación volvió a ser disuelta en 100 µL de agua y goteada en 4 medios de selección en ausencia de histidina, es decir, SD -Leu, -Trp, -His, y con concentraciones crecientes de 3-Amino-1,2,3,4-triazol o 3-AT (0, 2.5, 5 y 10 mM).

3.8 Co-inmunoprecipitación *in vitro*

Los ensayos de co-inmunoprecipitación *in vitro* se basan en el sistema TNT de Promega por lo que se hicieron con las construcciones basadas en el plásmido pTNT y generadas previamente mediante la tecnología Gateway: pTNTFLAG::JAZ6, pTNTFLAG::EIL1, pTNTFLAG::GFP, pTNTFLAG vacío y pTNTHA::GI. El vector pTNT permite la transcripción y traducción sintética de las proteínas JAZ6, EIL1, GFP y GI, las cuales se generan con una etiqueta, HA en el caso de GI y FLAG en las del resto, fusionada a su extremo N-terminal.

Concretamente, el sistema de expresión proteico utilizado es de Promega y se conoce como TnT SP6 High-Yield Wheat Germ. La expresión de las proteínas se hizo de manera simultánea, es decir, cada construcción (JAZ6-FLAG, EIL1-FLAG, GFP-FLAG o el control negativo pTNTFLAG vacío) fue co-expresada con la construcción GI-HA, con la que se pretendía evaluar el nivel de interacción. Cada reacción de TNT consistía en 1.5 µg de cada uno de los plásmidos en 30 µL del Máster Mix y completando hasta 50 µL con agua. Las reacciones se incubaron a 25 °C durante 3 horas.

Una vez co-expresadas las proteínas, de cada reacción se guardó el 5% (5 µL) como *input*, necesario para comprobar la adecuada expresión de cada proteína vía Western-blot. Concretamente, cada *input* se compone de 5 µL de la reacción de TNT, 15 µL de agua y 5 µL de tampón Laemmli 5x (0.3 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 0.5 M DTT, 50% de glicerol, 0.05% de azul bromofenol). El volumen restante de cada reacción se utilizó para realizar la inmunoprecipitación de GI, siguiendo el protocolo descrito en el artículo de Pedmale *et al.*, 2016. Cada inmunoprecipitación fue incubada en una solución de inmunoprecipitación (solución IP) formada por 50 mM de Tris HCl pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0.1% de

Tritón X-100 y agua hasta completar los 100 mL, a la que se añadieron inhibidores de proteasas (las fosfatasa PIC2 y PIC3 al 100x de concentración, 10 mM de la proteasa MG-132 y un *cocktail* de inhibidores de proteasas a través de la adición de Complete 1x de Roche) y un anticuerpo anti-HA de Roche, el cual se une a la proteína GI etiquetada con HA. Posteriormente, se agregaron bolas magnéticas con proteína G (bloqueadas con 1 mg/mL de BSA) y afines a las moléculas de anticuerpo anti-HA. Finalmente, las bolas magnéticas, ya fusionadas a GI y a sus interactores, se lavaron y fueron eluidas en 40 µL de tampón Laemmli 2x. Seguidamente, el 25% del volumen se utilizó para analizar la inmunoprecipitación y el otro 75% restante para analizar la co-inmunoprecipitación vía Western-blot, es decir, para valorar la eficiencia de proteína GI inmunoprecipitada y para evaluar si las proteínas testadas (JAZ6 y EIL1) co-inmunoprecipitan o no con GI, respectivamente.

Finalmente, tras la electroforesis de las proteínas en geles SDS-PAGE y posterior transferencia de estas a una membrana de PVDF, se utilizaron anticuerpos anti-HA (Roche) y anti-FLAG (Sigma) fusionados a una peroxidasa con el objetivo de detectar la señal de GI y de JAZ6, EIL1 y GFP, respectivamente.

3.9 Ensayo de *titulación*

En este contexto, el ensayo de *titulación* consiste en la evaluación de la disminución o no de proteína JAZ3 o JAZ6 que es capaz de co-inmunoprecipitar con MYC2 o EIL1 frente a concentraciones crecientes de GI. Por ello, este ensayo se realizó dos veces en paralelo, una de ellas inmunoprecipitando EIL1 y otra MYC2. Respecto al etiquetado de las proteínas, EIL1 y MYC2 quedaron fusionadas a FLAG, y GI y JAZ6 y JAZ3 a HA a través de las construcciones generadas mediante el sistema Gateway.

Inicialmente, y como se explicó en el subapartado anterior, tuvo lugar la expresión de las proteínas mediante el sistema de transcripción y traducción *in vitro* TNT (Promega) que, en este caso, fue de manera individual. Además, se utilizaron 6 concentraciones diferentes de GI a través de la adición de diferentes volúmenes de la reacción TNT de esta proteína (0, 1.75, 3.5, 7, 15, 22.75 µL). De esta manera, tras la expresión individual de las proteínas, concentraciones constantes de JAZ6 o JAZ3 fueron incubadas con las 6 diferentes concentraciones de GI. Concretamente, se utilizaron 7 µL de la reacción TNT de JAZ6 o JAZ3 en cada una de las 6 reacciones de incubación con GI. Además, a cada reacción se le añadió un volumen de 43 µL de solución IP. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 7 µL de EIL1 o MYC2 a cada una de las reacciones de incubación y se dejaron otros 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, de cada una de las 6 reacciones se guardó un 5% como *input* y el volumen restante se utilizó para inmunoprecipitar a EIL1 o MYC2. El protocolo seguido para ello es el mismo que el descrito en el subapartado anterior, salvo que en este caso el anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar fue el anticuerpo anti-FLAG (Sigma) y los anticuerpos empleados para la detección Western-blot fueron anti-FLAG (Sigma) y anti-HA (Roche) fusionados a una peroxidasa, los cuales fueron usados para analizar las inmunoprecipitaciones y los *inputs* de EIL1 o MYC2 y las co-inmunoprecipitaciones e *inputs* de JAZ6 o JAZ3 y GI, respectivamente.

3.10 Extracción de RNA y RT-qPCR

Los genotipos utilizados en el ensayo de RT-qPCR fueron los mutantes *gi-2;jaz3-1;jaz10-1* y *gi-2;jaz5-1;jaz10-1*, junto con los ecotipos control Col-0 y *gi-2*. De cada línea se sembraron tres réplicas biológicas de 60 a 80 semillas y fueron crecidas durante una semana con un fotoperiodo de día corto. La colección de las muestras vegetales se hizo a ZT0, seguida de la extracción de RNA con el kit GeneJet Plant RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).

Para la retrotranscripción (RT) se utilizó el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (nzytech) para lo cual fue necesario 1 µg de RNA, previamente tratado con DNAsaI. El cDNA generado fue amplificado

mediante PCR cuantitativa a tiempo real con TB Green Premix Ex Taq 2x (Tli RNase H Plus) de Takara en el equipo QuandStudio 1 (Thermo Fisher Scientific).

Se midió la expresión de 2 genes diana de MYC2, *BCAT4* (*BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 4*) (Schuster *et al.*, 2006) y *CYP79B3* (*CYTOCHROME P450, FAMILY 79, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 3*) (Naur *et al.*, 2003). Como control interno se utilizó el gen constitutivo *PP2A* (*PROTEIN PHOSPHATASE 2A*). La secuencia de los cebadores necesaria para la amplificación de estos loci se muestra en la tabla 3.

Propósito	Secuencia
PP2A, qPCR, directo	TAACGTGGCCAAAATGATGC
PP2A, qPCR, reverso	GTTCTCCACAACCGCTTGGT
BCAT4, qPCR, directo	CTGTAAGGCACTGCTTCCA
BCAT4, qPCR, reverso	ATAGCTTCGAGCCAATGTT
CYP79B3, qPCR, directo	CTTTGCTTACCGCTGATGAA
CYP79B3, qPCR, reverso	GCGTTTGATGGTTGTCTG

Tabla 3. Listado de cebadores utilizados para las RT-qPCRs.

3.11 Ensayo de infecciones con *Botrytis cinerea*

Los ecotipos utilizados fueron Col-0 y *gi-2*. Concretamente se sembraron dos réplicas de cada línea, cada una de ellas formada por 12 plantas. La siembra de las semillas, previamente esterilizadas y vernalizadas, se hizo en discos de sustrato de la marca Jiffy (<http://www.jiffypot.com/>), para evitar contaminación cruzada. Además, el crecimiento de las plantas tuvo lugar en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de día corto durante un mes.

Respecto a *Botrytis cinerea*, se utilizó un glicerinado de una cepa aportada por el laboratorio de Vera del IBMCP (CT200), a partir del cual se sembraron esporas en una placa de PDA (Potato Dextrose Agar). El crecimiento de *Botrytis* tuvo lugar durante un mes a 24°C en oscuridad, para mantener al patógeno asíncrono. Transcurrido el mes de crecimiento, se extrajeron esporas de la placa de PDA en agua estéril.

Para la inoculación se utilizó una concentración de 10⁶ de esporas en una solución de 1 mL de PDB (Potato Dextrose Broth), necesario para activar las hifas. Por ello, previamente a la inoculación, se cuantificó la concentración de esporas previamente extraídas.

La cuantificación se hizo utilizando 10 µL de una dilución 10⁻¹ de la solución de esporas extraídas y se empleó una cámara de Neubauer. Se hicieron dos contajes, cada uno de ellos con el objetivo de 40X del microscopio. El cálculo de la concentración se hizo utilizando la siguiente ecuación, donde *media* hace referencia a la media aritmética de los dos contajes realizados.

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{mL}} = \text{Media} \cdot \text{Dilución} \cdot 25 \cdot 10^4$$

De forma previa a la inoculación, el volumen de esporas calculado fue resuspendido en 1 mL de medio PDB. Además, las plantas fueron aclimatadas durante un día en cabinas que permiten condiciones del 100% de humedad. Se utilizaron 6 plantas de cada réplica para cada una de las inoculaciones, a ZT0 y a ZT8. Ello se hizo depositando 4 µL de las esporas resuspendidas en PDB en 3 hojas de diferentes estadios de desarrollo de cada planta. Seguidamente, las plantas continuaron su crecimiento con un fotoperiodo de día corto al 100% de humedad.

Los daños se midieron a los 4 días después de la inoculación. Para ello, se tomaron fotos de las plantas con un macrómetro y el área necrótica se contabilizó en mm² con el software Fiji del NIH ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Implicación de GI en la ruta de señalización por etileno

4.1.1 Metanálisis de genes regulados por GI y EIN3/EIL1

Para valorar la implicación de GI en la ruta de señalización por etileno, inicialmente se trató de determinar si genes diana de EIN3/EIL1 también son regulados por GI. Para ello, se compararon los genes diana y regulados por GI, con los genes diana y regulados por EIN3/EIL1, a partir de datos de ChIP-Seq y RNA-Seq, respectivamente. El objetivo de este metanálisis es determinar si la proporción de DEGs (genes expresados diferencialmente) y genes diana compartidos entre GI y EIN3/EIL1 es significativa. Para ello, se utilizaron herramientas bioinformáticas que serán comentadas en el apartado de materiales y métodos.

Respecto a GI, se utilizaron resultados de ChIP-Seq de GI y RNA-Seq del mutante *gi-2* generados por nuestro laboratorio. Concretamente, se aplicó un filtro en el RNA-Seq para trabajar con los genes diferencialmente expresados a ZT0 (*Zeitgeber Time*), que es cuando mayor efecto de GI se observa de acuerdo con estudios previos en nuestro laboratorio. En cuanto a EIN3/EIL1, se buscó en bibliografía datos de ChIP-Seq y RNA-Seq.

En su investigación, Chang y colaboradores (Chang *et al.*, 2013) identificaron dianas de EIN3 a través de ChIP-Seq. La comparación de estos loci con los genes diana de GI a través de un diagrama de Venn reveló un solapamiento significativo (figura 9A.). A su vez, también se identificó un solapamiento significativo entre los DEGs de *gi-2* a ZT0 y los genes diana compartidos por GI y EIN3 (figura 9B.).

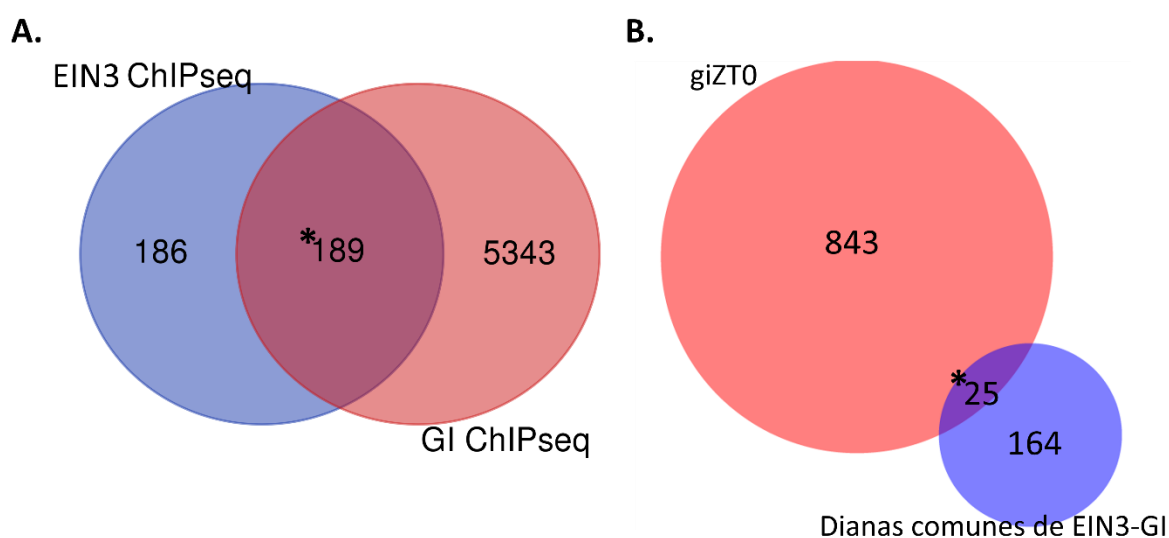


Figura 9. Diagramas de Venn con datos de EIN3. A. Diagrama de Venn entre el ChIP-Seq de EIN3 y el de GI. B. Diagrama de Venn entre el solapamiento del diagrama A y los DEGs de *gi-2* a ZT0. Los asteriscos (*) indican un solapamiento significativo (p-valor ≤ 0.05).

De acuerdo con la homología funcional que presentan *EIN3* y *EIL1*, se presupone que los resultados obtenidos a partir de uno de estos loci podrían extrapolarse al otro (Dolgikh et al., 2019). Sin embargo, con el objetivo de perfeccionar las conclusiones extraídas de este metanálisis, también se utilizó una investigación de Zhang y colaboradores (Zhang et al., 2018) en la que se generó un RNA-Seq del doble mutante *ein3;eil1*. De entre los genes diferencialmente expresados en el mutante *ein3;eil1* se determinó que hay un solapamiento significativo con los DEGs de *gi-2* a ZTO (figura 10).

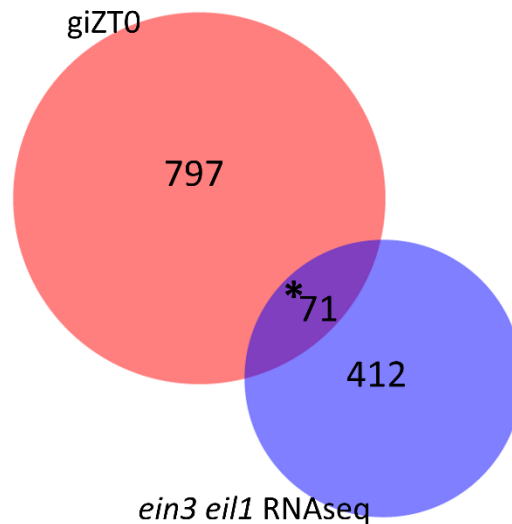


Figura 10. Diagrama de Venn con datos del doble mutante *ein3;eil1*. Diagrama de Venn entre los DEGs de *gi-2* a ZTO y los DEGs de *ein3;eil1*. Los asteriscos (*) indican un solapamiento significativo (p -valor ≤ 0.05).

Los resultados de estos metanálisis muestran que parece existir un solapamiento entre los genes controlados por GI y EIN3/EIL1, indicando una potencial implicación de GI en la ruta del etileno que será evaluada en el siguiente subapartado.

4.1.2 Evaluación fisiológica de la sensibilidad a ACC

Los resultados del subapartado anterior motivaron a investigar la potencial implicación de GI en la ruta del etileno. Para ello, se llevó a cabo un ensayo que trató de evaluar si mutantes de *GI* tienen afectada la señalización por etileno y, por ende, la respuesta fisiológica a esta hormona. Así, se realizó un ensayo con ACC, que es un precursor clave en la biosíntesis del etileno.

Este ensayo consta de dos réplicas debido a un fallo en la germinación de las semillas de *gi-2*. Respecto a la primera réplica, las líneas testadas fueron una línea sobreexpresante de *GI* (*GI Ox*), el mutante de pérdida de función *eil1* y el ecotipo silvestre Col-0. No se observó variación en la longitud del hipocotilo y la raíz en ausencia de ACC. Sin embargo, al suplementar este compuesto, los hipocotilos y raíces de la línea *eil1* fueron significativamente más largos que los de Col-0 y *GI Ox* (figura 11). A nivel de la curvatura del gancho apical, en ausencia de tratamiento, los ganchos de *eil1* y *GI Ox* se observaron significativamente más abiertos que los de Col-0 y, a su vez, los de *eil1* aún más significativamente abiertos que los de *GI Ox*. En contraposición, al añadir ACC, la reducción del ángulo del gancho que induce el etileno hizo que la curvatura sea igual entre todas las líneas, lo cual indica que la reducción de dicho ángulo fue mayor en los mutantes *eil1* y *GI Ox* en comparación con Col-0 (figura 3). A nivel cuantitativo, la reducción del ángulo de curvatura fue de 113.41°, 132.91° y 160.62° en Col-0, *GI Ox* y *eil1*, respectivamente.

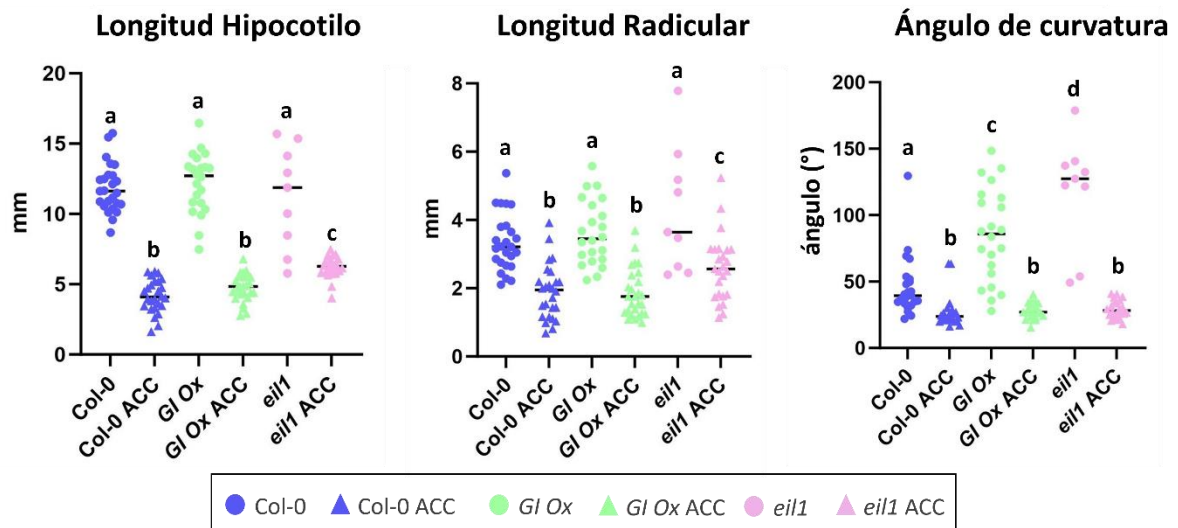


Figura 11. Variación cuantitativa de la triple respuesta a etileno entre Col-0, *GI Ox* y *eil1*. Se muestran los grupos estadísticamente homogéneos con el test de Tukey (p -valor ≤ 0.05).

Esta primera réplica indica que la sobreexpresión de *GI* no parece tener efectos sobre la respuesta al etileno a nivel del acortamiento del hipocotilo y de la raíz, pero sí podría tenerlos en cuanto a la curvatura del gancho apical. Además, la respuesta al etileno observada en la línea *eil1* demuestra que el ensayo ocurrió correctamente debido a que este mutante tiene una respuesta más atenuada a nivel estadístico, en comparación con Col-0. Aunque esto último no se observa a nivel de la curvatura del gancho apical.

En cuanto a la segunda réplica, se testó el genotipo *gi-2* y como control se utilizó la línea Col-0. La respuesta al etileno de estas líneas a nivel radicular fue igual. Sin embargo, los hipocotilos de *gi-2* fueron igual de cortos que los de Col-0 al añadir ACC, pero el acortamiento fue mayor en los mutantes de *gi-2*, ya que partían de un hipocotilo significativamente más largo en ausencia de ACC (figura 12). De manera que la reducción de la longitud del hipocotilo de Col-0 fue de 12.53 cm, mientras que la de *gi-2* de 13.11 cm.

En cuanto a la curvatura del gancho apical, ocurre algo similar que en la réplica anterior. El gancho de *gi-2* se observó significativamente más abierto que el de Col-0 en ausencia de ACC. Sin embargo, al suplementar ACC la curvatura es igual entre las dos líneas, indicando que la reducción del ángulo de curvatura del gancho de los mutantes de *gi-2* debió ser mayor, en comparación con Col-0 (figura 12). A nivel cuantitativo, la reducción del ángulo de curvatura de Col-0 fue de 73.41° y de 160.53° en *gi-2*.

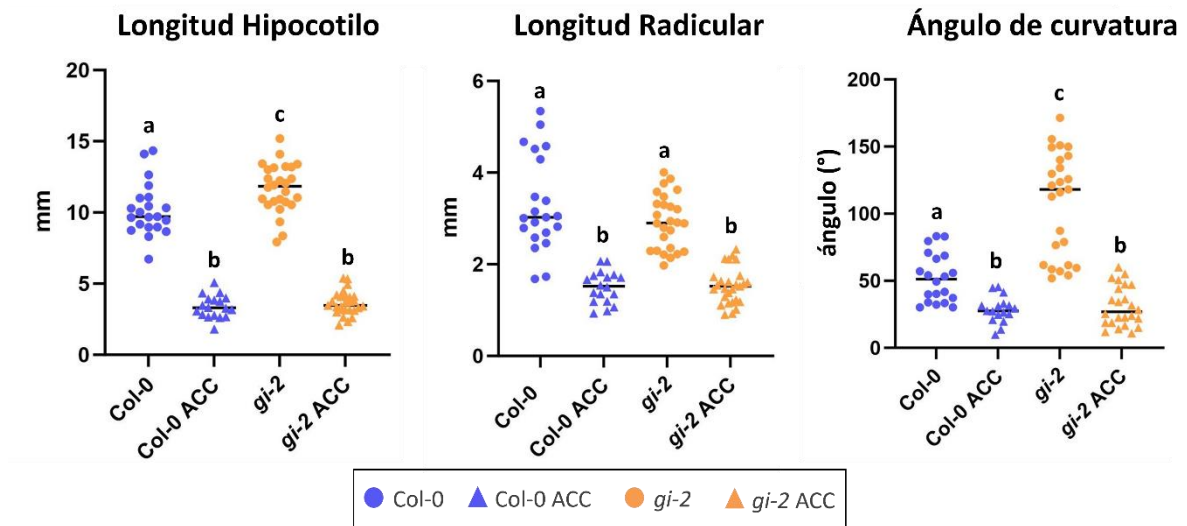


Figura 12. Figura Variación cuantitativa de la triple respuesta a etileno entre Col-0, gi-2. Se muestran los grupos estadísticamente homogéneos con el test de Tukey (p -valor ≤ 0.05).

Los resultados de esta segunda réplica indican que la mutación de pérdida de función de *GI* parece tener afectada la respuesta al etileno a nivel de la curvatura del gancho apical y de la longitud del hipocotilo.

Por consiguiente, *GI* parece tener efectos en la señalización por etileno ya que se han detectado diferencias significativamente estadísticas a nivel de la respuesta fisiológica a esta hormona en mutantes de este locus respecto a Col-0. En la siguiente figura se muestra una imagen representativa y cualitativa de la respuesta al etileno de cada genotipo (figura 13).

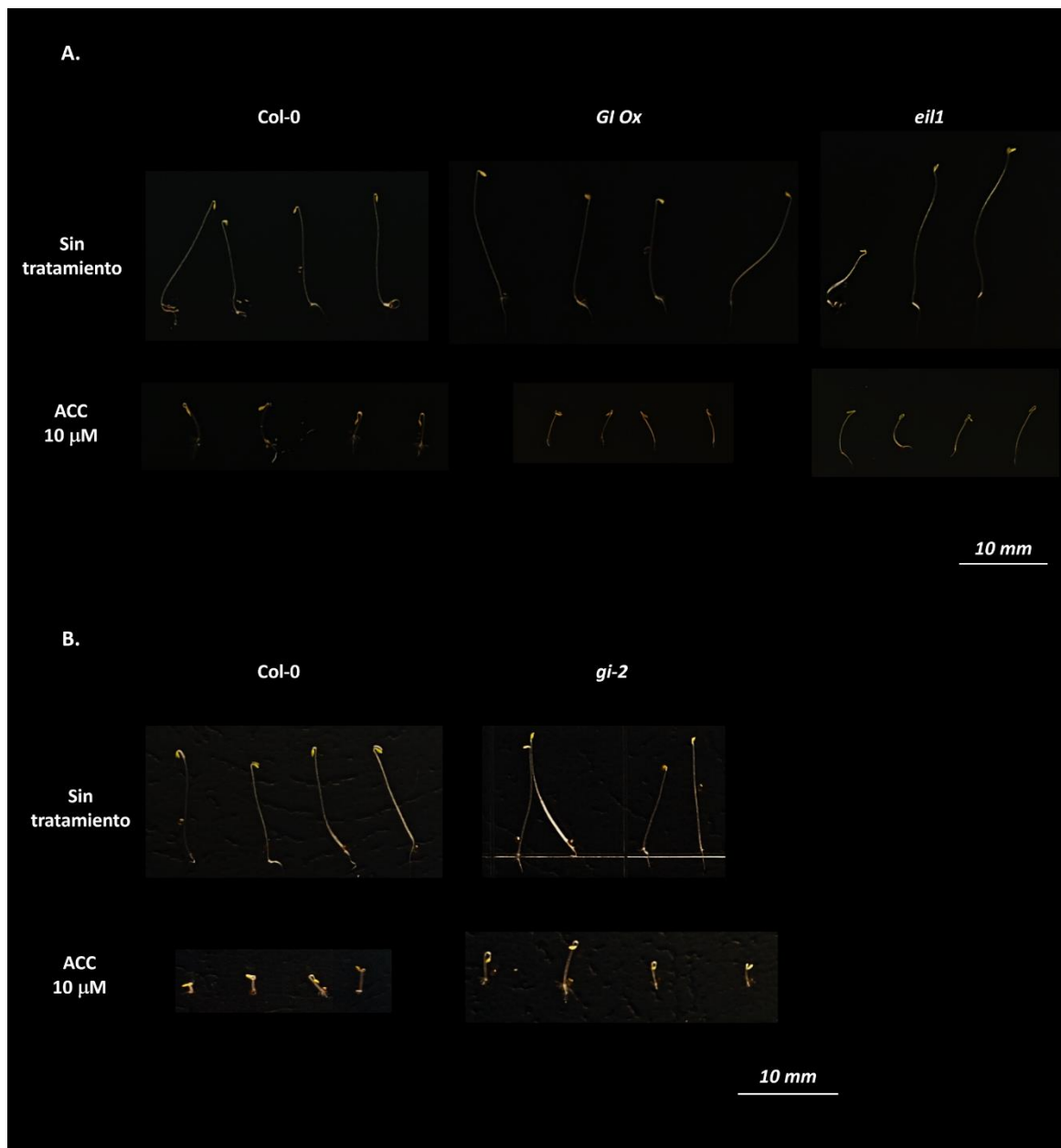


Figura 13. imágenes representativas de la respuesta a etileno de los genotipos Col-0, *GI Ox*, *eil1* y *gi-2*.

4.2 Interacción *in vitro*

4.2.1 Estudio de la potencial interacción entre *GI*, *JAZ6* y *EIL1*

Tal y como se ha comentado en apartados anteriores, rastreos preliminares de doble híbrido de alto rendimiento de nuestro laboratorio señalaron que *GI* interactúa con *JAZ3*, *JAZ4*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10* y *JAZ11*. Entre las proteínas *JAZ* interactoras reveladas no se encontraba *JAZ6*. Sin embargo, dada su relevancia en el contexto de la defensa frente a necrófitos (Ingle *et al.*, 2015), así como al elevado nivel de redundancia entre los *JAZ* (Liu *et al.*, 2021) y el hecho de que los rastreos de alto rendimiento suelen obtener falsos negativos (Brückner *et al.*, 2009), se decidió considerar a *JAZ6* (AT1G72450.1). Por otro lado, no se disponían de resultados previos sobre la interacción entre *GI* y los factores de transcripción *EIN3* y *EIL1*, lo que animó a su estudio debido al *crossstalk* entre las rutas del jasmonico y del etileno a través de las proteínas *JAZ* (Liu y Timko, 2021), así como a resultados preliminares sobre la potencial interacción entre *GI* y *MYC2*, que serán discutidos posteriormente. Puesto que en nuestro

laboratorio disponíamos de la secuencia de cDNA de *EIL1* clonada en un vector pEntry, todos los estudios moleculares se hicieron con este locus (AT2G27050). Y, puesto que *EIL1* y *EIN3* son homólogos funcionales (Dolgikh et al., 2019), se espera poder extrapolar los resultados obtenidos con *EIL1* a *EIN3*, aunque para una mayor fiabilidad de estas suposiciones se planteará desarrollar ensayos similares con *EIN3*.

A través de la base de datos DIURNAL (<http://diurnal.mocklerlab.org>) se ha comprobado que el pico de expresión máxima de *JAZ6* y *EIL1* coincide con el periodo de mayor acumulación y actividad de GI. Concretamente, la mayor acumulación de la proteína GI ocurre a ZT10-12 en fotoperiodos de día corto, alcanzando una mayor actividad regulatoria durante la noche (Nohales et al., 2019), que es cuando tiene lugar la máxima expresión de *JAZ6* y *EIL1*, concretamente a ZT18 con una correlación de 0.86 y 0.95, respectivamente.

Para caracterizar la interacción *in vitro* entre GI/*JAZ6* y GI/*EIL1* se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido utilizando el sistema CLONTECH®. Los cDNAs de *JAZ6* y *EIL1* fueron clonados en el vector pGADT7 y el cDNA de *GI* en el vector pGBKT7. Seguidamente, las distintas combinaciones pGADT7/pGBKT7 fueron co-transformadas en la cepa de levadura AH109. El goteo de las levaduras co-transformadas en placas SD (-Leu -Trp -His) con concentraciones crecientes de 3-AT (0, 2.5, 5, 10 mM) revelaron una interacción fuerte entre GI y *JAZ6*, pero una interacción muy débil o casi nula entre GI y *EIL1* (figura 14).

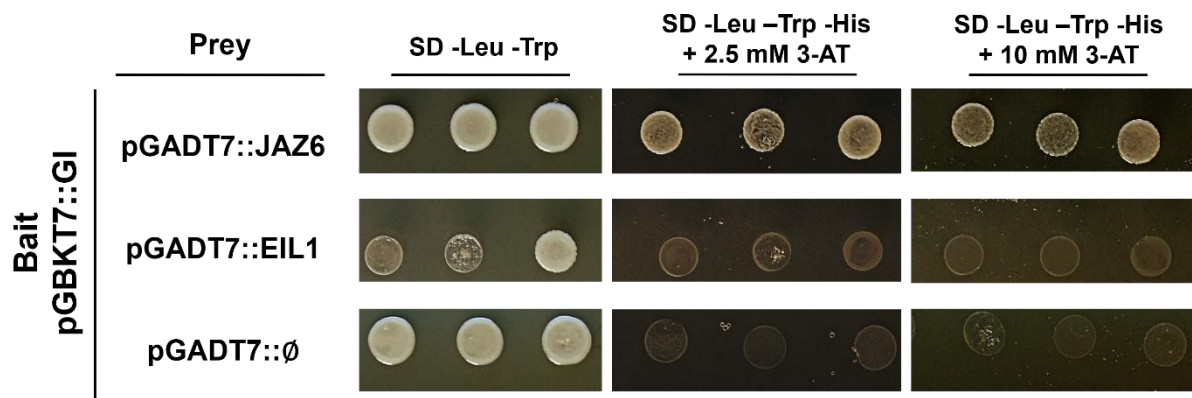
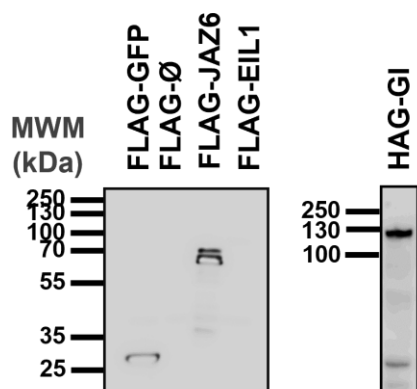


Figura 14. Ensayo de doble híbrido. Los cDNAs de los loci presa (*JAZ6* y *EIL1*) fueron clonados en pGADT7 y co-transformados con la construcción cebo pGBKT7::GI. Como control negativo se utilizó el vector pGADT7 vacío. SD -leu -trp es el medio de crecimiento y SD -leu -trp -his +3-AT es el medio de selección. Se muestra el crecimiento de tres réplicas biológicas independientes. Las concentraciones de 3-AT que se muestran son las más representativas del ensayo, 2.5 y 10 mM.

Posteriormente, se decidió revisar los resultados obtenidos en levadura mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación *in vitro* basado en el sistema de expresión TNT. Para ello, las proteínas *JAZ6* y *EIL1* fueron co-expresadas *in vitro*, a partir del vector pTNTFLAG, junto con GI, a partir del vector pTNTHA. De esta manera, las proteínas *JAZ6* y *EIL1* quedaron etiquetadas con FLAG y GI con HA. Además, se utilizaron dos controles negativos: el vector pTNTFLAG vacío y la construcción pTNTFLAG::GFP. Tras la co-expresión de las proteínas *in vitro*, se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA y la co-inmunoprecipitación se reveló aplicando un anticuerpo anti-FLAG. Como se observa en la figura 15B., *JAZ6* co-inmunoprecipitó con GI. Sin embargo, a la vista del *input* de la figura 15A., *EIL1* no se expresó adecuadamente por lo que no se pudo valorar su interacción con GI.

A. Input (5%)



B. IP:α-HA

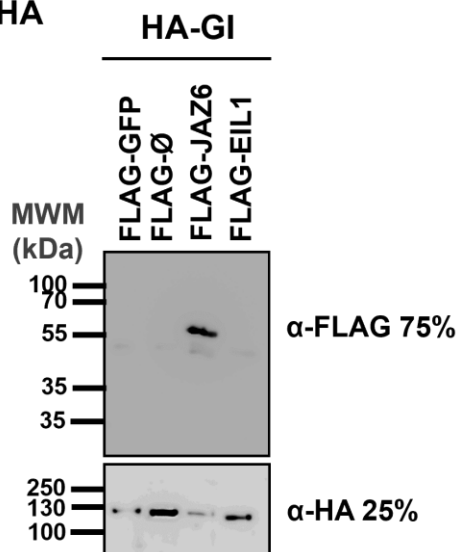
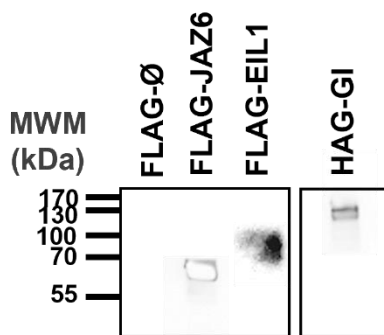


Figura 15. Western-blot del ensayo de co-inmunoprecipitación entre GI y JAZ6 y EIL1. A. Input (5% de la reacción). B. La parte de arriba son las proteínas co-inmunoprecipitadas y la de abajo las proteínas inmunoprecipitadas. Controles negativos: FLAG-GFP y pTNTFLAG vacío.

Es por ello por lo que se repitió este ensayo utilizando solo un control negativo (pTNTFALG vacío) y JAZ6 como control positivo (figura 16). En este caso, EIL1 también co-inmunoprecipitó con GI, aunque dando lugar a una señal menos intensa (figura 16B.), pudiendo indicar una interacción más débil entre EIL1 y GI, en comparación con la de JAZ6 con GI.

A. Input (5%)



B. IP:α-HA

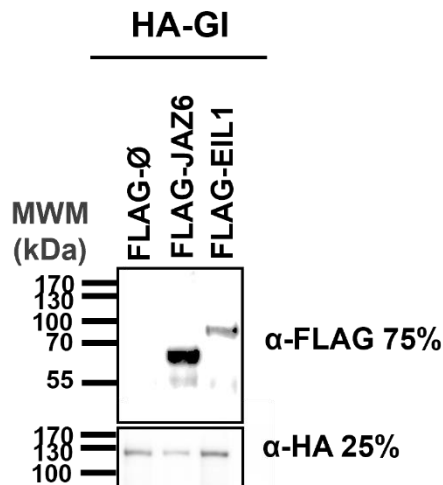


Figura 16. Western-blot del ensayo de co-inmunoprecipitación entre GI y EIL1. A. Input (5% de la reacción). B. La parte de arriba son las proteínas co-inmunoprecipitadas y la de abajo las proteínas inmunoprecipitadas. Control negativo: pTNTFLAG vacío. Control positivo: FLAG-JAZ6.

Los ensayos *in vitro* de este apartado revelan una potencial interacción entre GI y JAZ6 y GI y EIL1, que a su vez parece ser más fuerte en el caso de GI/JAZ6.

4.2.2 Estudio de la potencial competición molecular

A la vista de los resultados del subapartado anterior, y de acuerdo con antecedentes de nuestro laboratorio y bibliografía que revelan la potencial interacción entre GI y los JAZs, así como la actividad represora de los JAZ sobre MYC2 y EIL1 (Liu y Timk, 2021), se planteó estudiar a nivel mecanístico la potencial implicación de la interacción entre GI y JAZ con respecto a la actividad de MYC2 y EIL1. Concretamente, se trató de evaluar si la interacción entre GI y JAZ afectaba a la interacción entre JAZ y MYC2 o EIL1 y, por ende, a su represión. Para ello, se realizaron en paralelo dos ensayos, uno de ellos para evaluar el efecto de GI sobre la interacción JAZ6/EIL1 y otro para evaluar el efecto de GI sobre la interacción JAZ3/MYC2. Los ensayos realizados son los denominados de *titulación* en los que las proteínas fueron expresadas *in vitro* individualmente, utilizando el sistema TNT, de manera que GI, JAZ6 y JAZ3 quedaron etiquetadas con HA, y EIL1 y MYC2 con FLAG. Posteriormente, se incubaron JAZ6 y EIL1 o JAZ3 y MYC2 con cantidades crecientes de GI, con el objetivo de investigar si la presencia de GI interfería con la interacción entre los JAZs y los factores de transcripción a los que reprimen (MYC2 y EIL1). Tras la incubación, se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-FLAG.

Como se observa en la figura 17A, parece que GI interfiere en la interacción entre JAZ3 y MYC2. Esto se deduce debido a que al incubar JAZ3 y MYC2 con concentraciones crecientes de GI, la cantidad de JAZ3 que co-inmunoprecipitó con MYC2 disminuyó. A su vez, la ausencia de señal de GI en la co-inmunoprecipitación indica el posible mecanismo subyacente a lo que ocurre en este caso: GI compete con MYC2 por la interacción con JAZ3. Es decir, en el contexto del módulo JAZ3-MYC2, GI se une a una cierta cantidad de JAZ3, lo cual implica que una menor proporción de JAZ3 se une a MYC2.

Sin embargo, en lo que respecta al módulo JAZ6/EIL1, el mecanismo parece ser diferente (figura 17B). En este caso, la adición de concentraciones crecientes de GI también conllevó que una menor proporción de JAZ6 co-inmunoprecipitara con EIL1. Sin embargo, el hecho de que GI también co-inmunoprecipitase con EIL1 implica que múltiples razones podrían explicar el mecanismo subyacente a esta competición. Algunas de las posibilidades que inicialmente se barajan son las siguientes: GI podría interactuar tanto con JAZ6 como con EIL1, o bien, GI podría interactuar con el módulo JAZ6-EIL1 de diversas maneras.

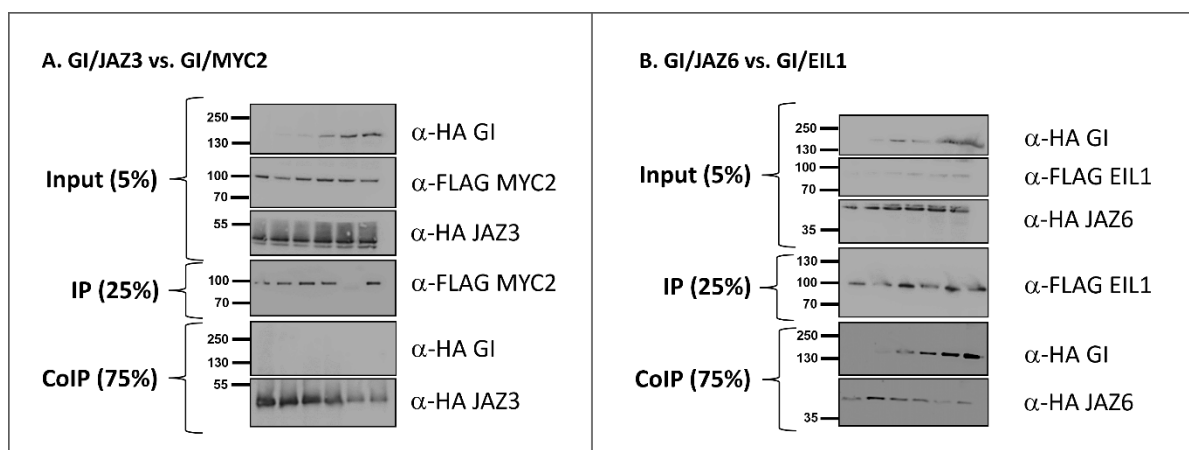


Figura 17. Western-blots del ensayo de titulación. Análisis de la competición molecular entre las parejas GI/JAZ3 y GI/MYC2 (A), y entre GI/JAZ6 y GI/EIL1 (B).

Los ensayos de *titulación* revelan un mecanismo de competición molecular entre las proteínas GI, JAZ6 y EIL1, y GI, JAZ3 y MYC2.

4.3 Participación de GI en la activación de respuestas defensivas

4.3.1 Análisis de la expresión génica

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores sobre la potencial interacción entre los módulos GI-JAZ, GI-MYC y GI-EIL motivaron a estudiar los posibles efectos de GI sobre la actividad de JAZ-MYC2 y JAZ-EIL1. Esta caracterización permite el estudio de la participación de GI en las respuestas defensivas, dada la implicación de las rutas del JA y del etileno en dichas respuestas (Huot *et al.*, 2014), a través de la familia de factores de transcripción MYC (Zhang *et al.*, 2019) y EIL (Binder, 2020), respectivamente.

Esta implicación de GI ya había sido previamente estudiada en nuestro laboratorio a nivel del módulo JAZ-MYC2. Para lo cual, había sido contemplada la conocida represión que ejercen las proteínas JAZ sobre la ruta del JA, a través de su interacción con los factores de transcripción de la familia MYC (Zhang *et al.*, 2019; Nguyen *et al.*, 2022). Por ello, fue analizada la expresión de genes diana de MYC2 como *BCAT4* y *CYP79B3*, que además también lo eran de GI, de acuerdo con metanálisis llevados a cabo en nuestro laboratorio. Dichos metanálisis también señalaron que el momento del día en el que se observa mayores efectos de GI sobre su expresión es a ZT0. Sin embargo, este análisis de la expresión solo se realizó en líneas de *gi-2* y en mutantes de bajo orden de JAZ (*jaz3-1*, *jaz10-1*, *gi-2;jaz3-1* y *gi-2;jaz10-1*) y no se obtuvieron diferencias lo suficientemente significativas. Esto motivó a que en el presente Trabajo Fin de Máster se repitieran los análisis con mutantes de mayor orden. Por ello, se determinó el nivel de expresión de *BCAT4* y de *CYP79B3* vía RT-qPCR a ZT0 en los dobles mutantes *jaz3-1;jaz10-1* y *jaz5-1;jaz10-1* y en los triples mutantes *gi-2;jaz3-1;jaz10-1* y *gi-2;jaz5-1;jaz10-1*, respecto a los ecotipos Col-0 y *gi-2* (figura 18). Inicialmente, fue necesaria la selección individual de individuos homocigotos, con el objetivo de fijar las líneas mutantes *jaz3-1;jaz10-1*, *jaz5-1;jaz10-1*, *gi-2;jaz3-1;jaz10-1* y *gi-2;jaz5-1;jaz10-1*.

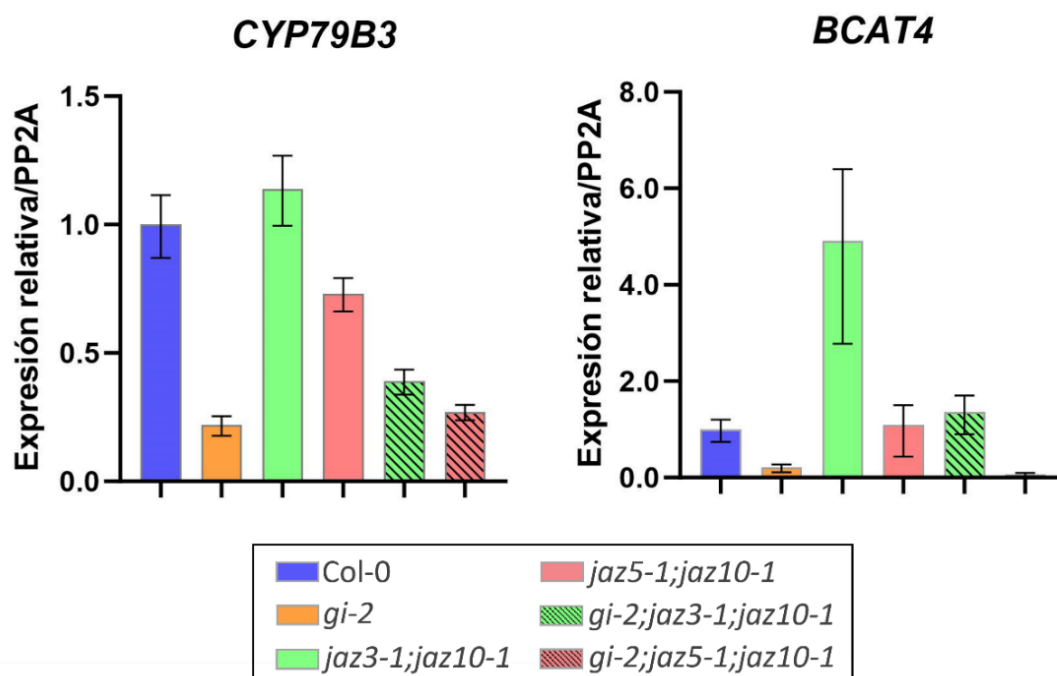


Figura 18. Expresión relativa de *CYP79B3* y *BCAT4* respecto a *PP2A*. Análisis de la expresión de *CYP79B3* y *BCAT4* a través de RT-qPCR en las líneas Col-0, *gi-2*, *jaz3-1;jaz10-1*, *jaz5-1;jaz10-1*, *gi-2;jaz3-1;jaz10-1* y *gi-2;jaz5-1;jaz10-1*. Se representa la media \pm SEM (n=3).

Como se muestra en la figura 18, se observó una reducción en los niveles de expresión de *CYP79B3* y de *BCAT4* de los mutantes de *gi-2*, respecto a Col-0. En el caso de *CYP79B3* (figura 18), esta represión se vio aliviada al mutar simultáneamente dos genes *JAZ* en el fondo *gi-2*, mientras que en el caso de *BCAT4* esta represión sólo se vio aliviada al introducir la combinación *jaz3-1;jaz10-1*.

Los resultados de este ensayo apuntan a que GI ejerce un efecto sobre la actividad del módulo JAZ-MYC2. De manera que la expresión de dianas de MYC2 parece reducirse en mutantes de *gi-2*, mientras que esta reducción se matizó al introducir mutaciones dobles de pérdida de función de *JAZ*. A su vez, se puede intuir que los efectos observados son diferentes según la mutación implique a *JAZ3* o a *JAZ5*. La pérdida de función de *JAZ5* en el doble mutantes *gi-2;jaz5-1;jaz10-1* no alivió tanto la represión como en la línea *gi-2;jaz3-1;jaz10-1*.

4.3.2 Ensayos de infecciones con *Botrytis cinerea*

La variación en los niveles de expresión de genes diana de MYC2 que se muestra en el subapartado anterior, apuntan a que GI ejerce un efecto sobre el módulo JAZ-MYC2, lo cual podría implicar una consecuente variación en las respuestas defensivas de la planta. Para tratar de revelar esta variación, se llevó a cabo un ensayo de infecciones con el patógeno *Botrytis cinerea* y el daño generado fue comparado entre los ecotipos Col-0 y *gi-2*, crecidos con fotoperiodo de día corto.

Como se muestra en la figura 19, se observó que la severidad de la infección por *Botrytis*, medida en tamaño de la necrosis en las hojas, fue mayor en *gi-2* respecto a Col-0 en los dos momentos de inoculación (ZT0 y ZT8) (figura 19A. y 19B.). A su vez, se obtuvo que en Col-0 la severidad fue mayor cuando la inoculación se hizo a ZT8, como era de esperar (Ingle *et al.*, 2015), mientras que esta temporalización de la respuesta se pierde en el mutante *gi-2* (figura 19A.).

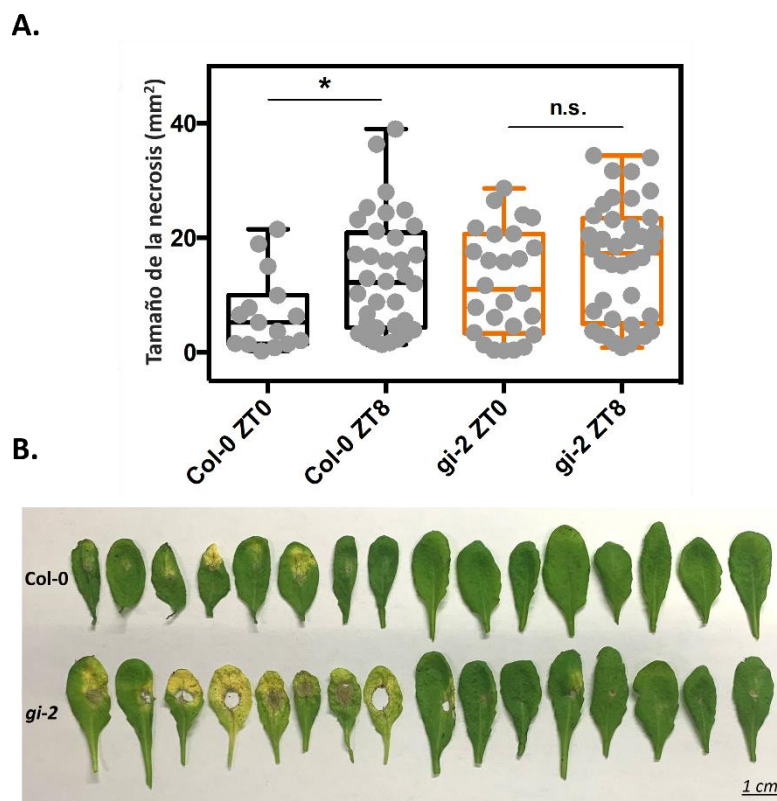


Figura 19. Infecciones de Col-0 y *gi-2* con *Botrytis cinerea*. **A.** Tamaño de la necrosis en función del genotipo (Col-0 y *gi-2*) y del momento de inoculación (ZT0 y ZT8). Las diferencias significativas se representan con un asterisco (*) para un p-valor ≤ 0.05 . Se utiliza n.s. para indicar que no hay diferencias significativas. **B.** Necrosis de hojas de Col-0 y *gi-2* inoculadas con *Botrytis cinerea* a ZT8 4 días después de la infección.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

El papel del reloj circadiano ha sido extensamente estudiado en el contexto de los estreses abióticos (Markham y Greenham, 2021). Sin embargo, en lo que respecta a la inmunidad vegetal, la potencial implicación de la regulación circadiana conforma un novedoso campo de estudio. De hecho, fue en torno a principios de la década anterior cuando se publicaron los primeros trabajos que pusieron de manifiesto la intercomunicación entre el reloj circadiano y la inmunidad vegetal, concretamente en la defensa frente a bacterias (Bhardwaj et al., 2011; Zhang *et al.*, 2013), oomicetos (Wang *et al.*, 2011) y herbívoros (Goodspeed *et al.*, 2012). En este contexto, las fitohormonas SA, JA y etileno conforman importantes temas de estudio, en cuanto a que están implicadas en la inmunidad vegetal y presentan regulación circadiana. Concretamente, el SA participa en la defensa frente a biótrotos, mientras que el JA y el etileno en la defensa frente a necrótrofos, además de a herbívoros, en el caso del JA (Huot *et al.*, 2014). Con respecto a la regulación circadiana que presentan las rutas de biosíntesis y de señalización de las fitohormonas, ello implica que, por ejemplo, el pico de acumulación del SA ocurra por la noche y el del JA a medio día (Zhang y Wang, 2019).

En el ámbito de nuestro laboratorio, la implicación del reloj circadiano en la ruta del JA ya ha tratado de ser caracterizada. Además, este tema de estudio se ha ampliado a la ruta del etileno. Ello se debe al *crosstalk* existente entre las rutas de señalización del JA y del etileno a nivel de las proteínas JAZ, las cuales reprimen las respuestas a estas hormonas (Liu y Timko, 2021). De hecho, mutantes que tienen afectadas las rutas del JA y del etileno muestran asincronía en la variación de la susceptibilidad frente al necrótrofo *Botrytis cinerea*, tal y como ocurre en mutantes del reloj (Ingle *et al.*, 2015). El presente Trabajo Fin de Máster se inserta en este marco de trabajo que plantea estudiar la participación del reloj circadiano en la intercomunicación entre las rutas del JA y del etileno.

En primer lugar, dado que la relación entre el reloj circadiano y la ruta del etileno no había sido previamente estudiada en nuestro laboratorio, se trató de determinar si la implicación del reloj en esta ruta es o no relevante. Los metanálisis indicaron que una proporción significativa de genes que son dianas de EIN3, también lo son de GI (figura 9.A). Este resultado individual era altamente esperable, ya que GI actúa en multitud de rutas y, por ende, tiene infinidad de interactores (Nohales *et al.*, 2019). Los metanálisis con el RNA-Seq del mutante *gi-2* a ZT0 indicaron que una fracción significativa de genes regulados por EIN3 y EIL1, también están controlados por GI (figura 9.B; figura 10). En su conjunto, estos resultados sustentan que hay una potencial regulación circadiana de la ruta de señalización del etileno, a través de la actividad de GI. A su vez, esta conclusión de que la ruta del etileno presenta control circadiano también era esperable a la vista de la investigación de Ingle y colaboradores. Ello se debe a que Ingle y colaboradores revelaron que, además de genes de respuesta al JA, los de respuesta al etileno presentan una variación temporal de su expresión ante infección por *B. cinerea*, la cual es regulada a nivel circadiano (Ingle *et al.*, 2015).

A la vista de las conclusiones anteriores, se pretendió determinar si la actividad de GI tiene algún efecto sobre la ruta de señalización del etileno, a través del ensayo de ACC. El planteamiento consistía en determinar si la pérdida o la ganancia de función de GI genera algún cambio significativo en alguna de las 3 respuestas al etileno: acortamiento del hipocotilo y de la raíz, y curvatura exagerada del gancho apical (Dugardeyn y Van Der Straeten, 2008). Tanto la línea de sobreexpresión (*GI Ox*) como la de pérdida de función (*gi-2*) mostraron diferencias significativas en al menos una de las respuestas al etileno respecto a Col-0. Concretamente, las variaciones observadas consistieron en el aumento del acortamiento del ángulo de curvatura y/o del hipocotilo, en comparación con Col-0 (figura 11 y figura 12, respectivamente). Esto se debe a que el ángulo de curvatura de las líneas *GI Ox* y *gi-2* era más abierto que el de Col-0, así como los hipocotilos de *gi-2* más elongadas que los de Col-0. Pero, al añadir

ACC, el efecto del etileno conllevó un mayor grado de reducción en estas líneas, lo que las llevó a no tener diferencias significativas respecto a Col-0. Además, era esperable que los hipocotilos de *gi-2* fueran más elongados que los de Col-0, debido a la falta de función de GI (Huq *et al.*, 2000). Sin embargo, estos resultados solo dan información acerca de si GI parece estar o no involucrada en la señalización por etileno. Y, a lo sumo, se puede inferir que las líneas analizadas responden en la misma dirección en comparación con la respuesta del control de fenotipo mínimo *eil1*, o si hay hipersensibilidad o hiposensibilidad al etileno. De manera que, debido a los genotipos analizados y a la complejidad molecular que genera la presencia de *crosstalk* entre las rutas, los datos obtenidos no pueden utilizarse para determinar las implicaciones moleculares de la hipersensibilidad o hiposensibilidad, ya que las correlaciones o conexiones no son directas. A su vez, el control *eil1* no tiene el fenotipo mínimo de respuesta al etileno, dado que en su fondo génico otros genes de la ruta con homología funcional siguen actuando, como es el caso de *EIN3*. Asimismo, en la figura 11 se puede observar que la respuesta al etileno sobre la curvatura del gancho apical de *eil1* no está matizada en comparación con Col-0. Ello se debe a que la reducción de la curvatura del gancho apical de estos mutantes fue mayor que la de los de Col-0, ya que partiendo de un ángulo más abierto sin ACC, al añadir tratamiento el ángulo de curvatura de *eil1* se iguala al de Col-0. Esto podría deberse, por ejemplo, a que las plantas control de *eil1* tuvieran unos ganchos apicales con una curvatura menor de la que debiera, por ejemplo. Además, de por esta razón también se plantea repetir este ensayo para que sea más informativo, para lo cual estamos en proceso de generar el doble mutante *gi-2;eil1*.

Las conclusiones obtenidas apuntan hacia un potencial efecto de GI sobre la ruta del etileno, debido a lo cual se comprobó la interacción *in vitro* entre GI y EIL1. Además, datos previos de nuestro laboratorio habían revelado una potencial interacción positiva entre GI y MYC2, a través de co-inmunoprecipitaciones *in vitro*. Estos resultados fueron inesperados, pero ciertamente no sorprendentes, ya que GI muestra el mismo modo de acción, por ejemplo, en su regulación de los factores de transcripción PIF a través de la interacción con sus represores, las proteínas DELLA. Esto ocurre en el contexto de la regulación del crecimiento vegetativo que lleva a cabo GI, en la que es capaz de reprimir a los factores de transcripción PIF y estabilizar a sus represores, las proteínas DELLA, con las que interactúan (Nohales *et al.*, 2019). Esto también motivó a comprobar si EIL1 también pudiera interactuar con GI. Y, a su vez, también se comprobó la interacción entre JAZ6 y GI, ya que no había sido estudiada previamente en nuestro laboratorio.

La interacción fuerte que revelaron los ensayos de doble híbrido (figura 14) y el de TNT (figura 15) entre el módulo GI-JAZ6 era de esperar, ya que datos preliminares de nuestro laboratorio mostraron que GI interactúa con muchas de las proteínas JAZ. Y, en lo que respecta a EIL1 (figura 14; figura 16), los resultados son similares a los de MYC2, lo cual también era esperable. Sin embargo, para poder esclarecer si GI realmente interacciona con EIL1 será necesario llevar a cabo una co-inmunoprecipitación a través de un sistema de expresión de proteínas *in vivo*, tanto de manera transitoria (en *Nicotiana benthamiana*) como de manera estable (en *Arabidopsis thaliana*). Y también será interesante validar la interacción del módulo GI-JAZ6 *in vivo*.

Debido a las potenciales interacciones entre GI-EIL1, GI-MYC2 y GI-JAZ, se planteó estudiar si hay algún tipo de competición molecular a través del ensayo de *titulación*. Asimismo, en bibliografía hay datos que revelan la interacción de diversas proteínas JAZ (JAZ1, JAZ3, JAZ9) con EIN3 y EIL1, a través de ensayos de doble híbrido en levadura. De hecho, la interacción JAZ1-EIN3 fue comprobada *in vivo*. Y, a su vez, han revelado que el dominio con el que las proteínas JAZ interactúan con MYC2, parece ser el mismo a través del cual se unen a EIN3 (Zhu *et al.*, 2011). No se han encontrado trabajos que estudien la interacción de JAZ6 con EIL1, pero el hecho de que otras proteínas JAZ interactúen con EIL1 motivó a llevar a cabo este ensayo de competición molecular. Además, la interacción del módulo JAZ-EIL1 era

de esperar debido a que las proteínas JAZ reprimen a EIN3/EIL1 (Liu y Timko, 2021). Los resultados obtenidos del ensayo de *titulación* revelaron que hay un mecanismo de competición molecular entre las proteínas GI-JAZ3-MYC2, y entre GI-JAZ6-EIL1. En el primer módulo de interactores, el mecanismo subyacente a la competición se observa más claro: GI parece secuestrar una fracción de JAZ3 de la proporción de JAZ3 unida a MYC2 (figura 17A). Y en el caso del segundo módulo, parece que en este contexto GI podría interactuar tanto con JAZ6 como con EIL1 (figura 17B.). En definitiva, se revela un mecanismo de competición molecular, aunque parezca ser diferente según la proteína JAZ que se trate, además de si en el módulo se encuentre MYC2 o EIL1. Esto podría indicar una diferente afinidad entre GI y sus distintos interactores, según el fondo genético en el que se encuentre. Por eso, se plantean futuros estudios en los que se repita este ensayo con otras combinaciones, como por ejemplo con el módulo GI-JAZ3-EIL1.

Los resultados obtenidos referentes a las interacciones, así como datos preliminares de nuestro laboratorio, motivaron a ampliar la caracterización de la implicación de GI en la actividad del módulo JAZ-MYC2. Por ello, se estudió la expresión relativa de genes diana de MYC2 en mutantes de pérdida de función de JAZ de mayor orden, tanto en fondo Col-0, como en fondo *gi-2* (figura 18). Se observó que la adición de *gi-2* conlleva una reducción de la expresión, mientras que la adición de las dobles mutaciones *jaz* alivia dicha represión. Aunque para *BCAT4*, el alivio de la represión solo se observa al introducir la combinación *jaz3-1;jaz10-1*. Esto último podría deberse a la diferente contribución de cada proteína JAZ (Liu *et al.*, 2021).

Los análisis de la expresión relativa de este Trabajo Fin de Máster contribuyen a la investigación en la que se inserta este proyecto. Sin embargo, no son del todo concluyentes ya que no han podido ser avalados estadísticamente. Ello se debe a que estos análisis se han hecho con 3 réplicas técnicas, en lugar de biológicas. A su vez, esto también podría explicar el elevado error asociado obtenido en algunos de los genotipos. Asimismo, será necesario llevar a cabo estos análisis para comprobar los efectos de GI en el módulo JAZ-EIL1. Para ello, se requerirá un metanálisis que permita identificar genes diana comunes a GI y a EIL1. Los genes diana identificados serán los utilizados en los análisis de expresión y los resultados esperados serán similares a los esperados para el módulo JAZ-MYC. Ello se debe a que las proteínas JAZ reprimen tanto a la ruta del JA como la del etileno, a través de su interacción con MYC y EIN3/EIL1 (Liu y Timko, 2021).

Se planteó tratar de conectar la implicación de GI, observada a nivel molecular, con el fenotipo. Para ello, se realizó el ensayo de infecciones con *B. cinerea*, ya que esto permite evaluar los efectos de GI en el contexto de la inmunidad frente a necrótrofos, que son los patógenos frente a los que responden las fitohormonas JA y etileno (Huot *et al.*, 2014). Se obtuvo que el ecotipo *gi-2* presenta una mayor susceptibilidad (figura 19A. y 19B.). Este era el resultado esperado y coherente con la hipótesis de este Trabajo Fin de Máster. Ya que, si GI está implicada en el *crossstalk* entre las rutas del JA y el etileno, y a su vez, reprime a los represores JAZ, la falta de función de GI supondría una menor activación de las rutas de señalización de estas hormonas y, por ende, una mayor susceptibilidad. Otro aspecto relevante de este ensayo es la temporalización de la respuesta a la infección. Según Ingle y colaboradores, la susceptibilidad de las plantas es mayor ante inoculaciones al final del fotoperiodo (en días largos) (Ingle *et al.*, 2015). En nuestro ensayo se observa que *gi-2* pierde dicha temporalización (figura 19A.), lo cual podría indicar que la actividad de GI es esencial para mantener la temporalización en la respuesta a *Botrytis*. También cabe destacar que la influencia del reloj de los dos organismos (*A. thaliana* y *B. cinerea*) es una pieza clave que determina el éxito de la infección (Hevia *et al.*, 2015; Ingle *et al.*; 2015). Por ello, para estudiar la implicación del reloj circadiano vegetal, este ensayo se ha llevado a cabo inoculando con esporas provenientes del patógeno *Botrytis* crecido en condiciones de asincronía. Sin embargo, la contribución de cada organismo a la infección es compleja. Por ejemplo,

una investigación sustenta que, en el contexto de esta infección en condiciones de día largo, es el reloj de *Botrytis* el que tiene mayor peso en comparación con el de *A. thaliana* (Hevia *et al.*, 2015). Asimismo, una reciente publicación ha revelado que *Botrytis* tiene receptores de luz que afectan significativamente al éxito de la infección (Pérez-Lara *et al.*, 2023). Por lo tanto, a pesar de utilizar esporas de *Botrytis* asíncrono, el éxito de la infección podría no solo depender del reloj vegetal, sino que también de la reducción de la expresión de factores de virulencia que ocurre en *Botrytis* como consecuencia de la percepción de luz.

Además, este ensayo de infecciones se ha repetido durante el presente Trabajo Fin de Máster con la colaboración de Francisco José Escaray, del laboratorio de Vera del IBMCP (resultados aún en procesamiento). A la vista de los resultados preliminares, parece no haber diferencias significativas entre genotipos. Esto podría deberse a las condiciones de la cámara de cultivo utilizada, entre a otros motivos.

En definitiva, sería necesario repetir el ensayo de infecciones e incluso valorar modificarlo para estudiar también la interacción entre los relojes circadianos de la planta y el patógeno, así como la contribución de otros genes como los *JAZ*. De hecho, hay evidencias que sustentan que según el *JAZ* (o la combinación de *JAZs*) que sea mutado la respuesta a la infección cambiaría (Liu *et al.*, 2021).

Esta parte de la investigación es relativamente novedosa, como ya se ha comentado anteriormente, lo cual hace necesario llevar a cabo diversos tipos de ensayos para asegurar conocer extensamente la contribución del reloj en la inmunidad vegetal. Por ejemplo, otras investigaciones recientes señalan que los mutantes de pérdida de función de *GI* son más resistentes a *Fusarium oxysporum*, hongo hemibiótrofo (Patnaik *et al.*, 2023). Por ello, también será de relevancia estudiar los ensayos de infecciones con otros patógenos.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

- I. Los metanálisis han revelado que genes regulados por EIN3/EIL1 también están controlados por GI. Esto sustenta que GI está implicada en la ruta de señalización del etileno.
- II. La triple respuesta al etileno de las líneas *GI Ox* y *gi-2* varía respecto a la de Col-0, y en la misma dirección que la triple respuesta del mutante *eil1*. Esto evidencia, a nivel fisiológico, que GI tiene algún efecto sobre la señalización del etileno.
- III. Ensayos de doble híbrido en levadura y de co-inmunoprecipitación *in vitro* han revelado que GI interactúa con JAZ6 y con EIL1. El módulo de interacción GI-JAZ6 es notablemente más fuerte que el de GI-EIL1, el cual es muy débil.
- IV. Ensayos de *titulación* basados en co-inmunoprecipitaciones *in vitro* sustentan la existencia de un mecanismo de competición molecular entre los módulos de interacción GI-JAZ6-EIL1 y GI-JAZ3-MYC2.
- V. La mutación de pérdida de función de *GI (gi-2)* conlleva la reducción de la expresión relativa de genes diana de MYC2. Mientras que los dobles mutantes para *JAZ* alivian dicha represión. Esto sustenta que GI podría tener un papel en la activación de las respuestas defensivas frente a patógenos necrótrofos.
- VI. El mutante de pérdida de función de *GI (gi-2)* muestra una mayor susceptibilidad frente a *Botrytis cinerea* en comparación con Col-0 y en los dos momentos de inoculación evaluados (a ZT0 y a ZT8). Además, el mutante *gi-2* pierde la temporalización de la respuesta defensiva.

Me gustaría agradecer a la Dra. Marian Nohales por acogerme en su laboratorio, permitirme continuar mi formación y guiarme en este camino. También a los miembros del grupo Plant Singaling por haberme ayudado y apoyado, especialmente a Carlos y a Clara. Y a Fran del laboratorio de Vera por instruirme en una parte muy importante de este proyecto.

A mis amigos de Valencia, agradecerles haber hecho de esta ciudad mi segunda casa, especialmente a Marhuenda, Silvia, Paula y Jose.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Bhardwaj, V., Meier, S., Petersen, L. N., Ingle, R. A., & Roden, L. C. (2011). Defence responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Pseudomonas syringae* are regulated by the circadian clock. *PLoS one*, *6*(10), e26968.
- Binder, B. M. (2020). Ethylene signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(22), 7710-7725.
- Binder, B. M., Walker, J. M., Gagne, J. M., Emborg, T. J., Hemmann, G., Bleecker, A. B., & Vierstra, R. D. (2007). The *Arabidopsis* EIN3 binding F-Box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *The Plant Cell*, *19*(2), 509-523.
- Brandoli, C., Petri, C., Egea-Cortines, M., & Weiss, J. (2020). Gigantea: uncovering new functions in flower development. *Genes*, *11*(10), 1142.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences*, *10*(6), 2763-2788.
- Cha, J.-Y., Kim, J., Kim, T.-S., Zeng, Q., Wang, L., Lee, S. Y., Kim, W.-Y., & Somers, D. E. (2017). GIGANTEA is a co-chaperone which facilitates maturation of ZEITLUPE in the *Arabidopsis* circadian clock. *Nature Communications* *8*(1), 3.
- Chang, K. N., Zhong, S., Weirauch, M. T., Hon, G., Pelizzola, M., Li, H., Huang, S.-S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Kuo, D., Nery, J. R., Qiao, H., Yang, A., Jamali, A., Chen, H., Ideker, T., Ren, B., Bar-Joseph, Z., Hughes, T. R., & Ecker, J. R. (2013). Temporal transcriptional response to ethylene gas drives growth hormone cross-regulation in *Arabidopsis*. *elife*, *2*, e00675.
- de Leone, M. J., Hernando, C. E., Mora-García, S., & Yanovsky, M. J. (2020). It's a matter of time: The role of transcriptional regulation in the circadian clock-pathogen crosstalk in plants. *Transcription*, *11*(3-4), 100-116.
- Dolgikh, V. A., Pukhovaya, E. M., & Zemlyanskaya, E. V. (2019). Shaping ethylene response: the role of EIN3/EIL1 transcription factors. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1030.
- Dugardeyn, J., & Van Der Straeten, D. (2008). Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant science*, *175*(1-2), 59-70.
- Edwards, Johnstone, & Thompson. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 6, 4(6), 2760-2763. <https://doi.org/10.13031/aim.20141900217>
- Fankhauser, C., & Staiger, D. (2002). Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta*, *216*, 1-16.
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., & Putterill, J. (1999). GIGANTEA: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO Journal*, *18*(17), 4679-4688. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.17.4679>
- Goodspeed, D., Chehab, E. W., Min-Venditti, A., Braam, J., & Covington, M. F. (2012). *Arabidopsis* synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(12), 4674-4677.
- Gould, P. D., Locke, J. C., Larue, C., Southern, M. M., Davis, S. J., Hanano, S., Moyle, R., Milich, R., Putterill, J., Millar, A. D., & Hall, A. (2006). The molecular basis of temperature compensation in the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell*, *18*(5), 1177-1187.
- Greenham, K., & McClung, C. R. (2015). Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics*, *16*(10), 598-610.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A., & Kay, S. A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, *290*(5499), 2110-2113.
- Herrero, E., Kolmos, E., Bujdosó, N., Yuan, Y., Wang, M., Berns, M. C., Uhlworm, H., Coupland, G., Saini, R., Jaskolski, M., Webb, A., Gonçalves, J., & Davis, S. J. (2012). EARLY FLOWERING4 recruitment of EARLY FLOWERING3 in the nucleus sustains the *Arabidopsis* circadian clock. *The Plant Cell*, *24*(2), 428-443.

- Hevia, M. A., Canessa, P., Müller-Esparza, H., & Larrondo, L. F. (2015). A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(28), 8744-8749.
- Huang, H., Liu, B., Liu, L., & Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. *Journal of experimental botany*, *68*(6), 1349-1359.
- Hulsen, T., de Vlieg, J., & Alkema, W. (2008). BioVenn—a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC genomics*, *9*(1), 1-6.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth–defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*, *7*(8), 1267-1287.
- Huq, E., Tepperman, J. M., & Quail, P. H. (2000). GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(17), 9789-9794.
- Ingle, R. A., Stoker, C., Stone, W., Adams, N., Smith, R., Grant, M., Carré, I., Roden, L. C., & Denby, K. J. (2015). Jasmonate signalling drives time-of-day differences in susceptibility of *Arabidopsis* to the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, *84*(5), 937-948.
- Ji, Y., & Guo, H. (2013). From endoplasmic reticulum (ER) to nucleus: EIN2 bridges the gap in ethylene signaling. *Molecular plant*, *6*(1), 11-14.
- Liu, B., Seong, K., Pang, S., Song, J., Gao, H., Wang, C., Zhai, J., Zhang, Y., Gao, S., Li, X., Qi, T., & Song, S. (2021). Functional specificity, diversity, and redundancy of *Arabidopsis* JAZ family repressors in jasmonate and COI1-regulated growth, development, and defense. *New Phytologist*, *231*(4), 1525-1545.
- Liu, H., & Timko, M. P. (2021). Jasmonic acid signaling and molecular *crossstalk* with other phytohormones. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(6), 2914.
- Liu, Y., Sun, Y., Yao, H., Zheng, Y., Cao, S., & Wang, H. (2022). *Arabidopsis* Circadian Clock Repress Phytochrome A Signaling. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 809563.
- Markham, K. K., & Greenham, K. (2021). Abiotic stress through time. *New Phytologist*, *231*(1), 40-46.
- McClung, C. R. (2014). Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the *Arabidopsis* circadian clock. *F1000prime reports*, *6*.
- Meldau, S., Erb, M., & Baldwin, I. T. (2012). Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of botany*, *110*(8), 1503-1514.
- Mishra y Panigrahi, 2015 Liu, Y., Sun, Y., Yao, H., Zheng, Y., Cao, S., & Wang, H. (2022). *Arabidopsis* Circadian Clock Repress Phytochrome A Signaling. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 809563.
- Mishra, P., & Panigrahi, K. C. (2015). GIGANTEA—an emerging story. *Frontiers in plant science*, *6*, 8.
- Naur, P., Hansen, C. H., Bak, S., Hansen, B. G., Jensen, N. B., Nielsen, H. L., & Halkier, B. A. (2003). CYP79B1 from *Sinapis alba* converts tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *409*(1), 235-241. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00567-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00567-2)
- Nguyen, T. H., Goossens, A., & Lacchini, E. (2022). Jasmonate: A hormone of primary importance for plant metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, *67*, 102197.
- Nohales, M. A., & Kay, S. A. (2016). Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature structural & molecular biology*, *23*(12), 1061-1069.
- Nohales, M. A., Liu, W., Duffy, T., Nozue, K., Sawa, M., Pruneda-Paz, J. L., Maloof, J. N., Jacobsen, S. E., & Kay, S. A. (2019). Multi-level modulation of light signaling by GIGANTEA regulates both the *output* and pace of the circadian clock. *Developmental cell*, *49*(6), 840-851.
- Oravec, M. W., & Greenham, K. (2022). The adaptive nature of the plant circadian clock in natural environments. *Plant physiology*, *190*(2), 968-980.
- Park, H. J., Kim, W. Y., & Yun, D. J. (2016). A new insight of salt stress signaling in plant. *Molecules and cells*, *39*(6), 447.
- Patnaik, A., Kumar, A., Behera, A., Mishra, G., Dehery, S. K., Panigrahy, M., Das, A. B., & Panigrahi, K. C. (2023). GIGANTEA suppresses wilt disease resistance by down-regulating the jasmonate

- signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1091644.
- Pedmale, U. V., Huang, S. S. C., Zander, M., Cole, B. J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P. A. B., Pérez-Lara, G., Olivares-Yañez, C., van Bakel, H., Larrondo, L. F., & Canessa, P. (2023). Genome-Wide Characterization of Light-Regulated Gene Expression in *Botrytis cinerea* Reveals Underlying Complex Photobiology. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(10), 8705.
- Rédei, G. P. (1962). Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics*, *47*(4), 443.
- Saini, R., Jaskolski, M., & Davis, S. J. (2019). Circadian oscillator proteins across the kingdoms of life: structural aspects. *BMC biology*, *17*(1), 1-39.
- Sauerbrunn, N., & Schlaich, N. L. (2004). PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in *Arabidopsis*. *Planta*, *218*, 552-561.
- Schuster, J., Knill, T., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Binder, S. (2006). BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *18*(10), 2664–2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039339>
- Shin, J., Heidrich, K., Sanchez-Villarreal, A., Parker, J. E., & Davis, S. J. (2012). TIME FOR COFFEE represses accumulation of the MYC2 transcription factor to provide time-of-day regulation of jasmonate signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(6), 2470-2482.
- Staswick, P. E. (2008). JAZing up jasmonate signaling. *Trends in plant science*, *13*(2), 66-71.
- Vandenbussche, F., Petrášek, J., Žádníková, P., Hoyerová, K., Pešek, B., Raz, V., Swarup, R., Bennett, M., Zažímalová, E., Benková, E., & Van Der Straeten, D. (2010). The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development*, *137*(4), 597-606.
- Wang, W., Barnaby, J. Y., Tada, Y., Li, H., Tör, M., Caldelari, D., Lee, D., Fu, X.-D., & Dong, X. (2011). Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature*, *470*(7332), 110-114.
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L., & Huq, E. (2015). Illuminating progress in phytochrome-mediated light signaling pathways. *Trends in plant science* *20*(10), 641-650.
- Sridevi, P., Nito, K., Nery, J. R., Ecker, J. R., & Chory, J. (2016). Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. *Cell*, *164*(1), 233-245.
- Xu, X., Yuan, L., Yang, X., Zhang, X., Wang, L., & Xie, Q. (2022). Circadian clock in plants: Linking timing to fitness. *Journal of integrative plant biology*, *64*(4), 792-811.
- Zarei, A., Körbes, A. P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., & Memelink, J. (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, *75*, 321-331.
- Zhang, C., Gao, M., Seitz, N. C., Angel, W., Hallworth, A., Wiratan, L., Darwish, O., Alkharouf, N., Dawit, T., Lin, D., Egoshi, R., Wang, X., McClung, C. R., & Lu, H. (2019). LUX ARRHYTHMO mediates crosstalk between the circadian clock and defense in *Arabidopsis*. *Nature communications*, *10*(1), 2543.
- Zhang, C., Xie, Q., Anderson, R. G., Ng, G., Seitz, N. C., Peterson, T., McClung, C. R., McDowell, J. M., Kong, D., Kwak, J. M., & Lu, H. (2013). Crosstalk between the circadian clock and innate immunity in *Arabidopsis*. *PLoS pathogens*, *9*(6), e1003370.
- Zhang, X., Ji, Y., Xue, C., Ma, H., Xi, Y., Huang, P., Wang, H., An, F., Li, B., Wang, Y., & Guo, H. (2018). Integrated regulation of apical hook development by transcriptional coupling of EIN3/EIL1 and PIFs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *30*(9), 1971-1988.
- Zhang, Y., Bo, C., & Wang, L. (2019). Novel crosstalks between circadian clock and jasmonic acid pathway finely coordinate the tradeoff among plant growth, senescence and defense. *International journal of molecular sciences*, *20*(21), 5254.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., Jiang, Z., Kim, J.-M., To, T. K., Li, W., Zhang, X., Yu, Q., Dong, Z., Chen, W.-Q., Seki, M., Zhou, J.-M., & Guo, H. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(30), 12539-12544.

