



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

TRABAJO FIN DE MÁSTER

---

# **Regulación hormonal y transcripcional del metabolismo secundario en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. en respuesta a elicitores inorgánicos y hormonales**

---

**Presentado por:  
EVA CAÑIZARES RAMOS**

**Tutor Universitat Jaume I:  
MIGUEL GONZÁLEZ GUZMÁN**

**Cotutor Universitat Jaume I:  
VICENT ARBONA MENGUAL**

**Tutor Universitat Politècnica de València:  
JOSÉ MIGUEL MULET SALORT**

Valencia, febrero 2022



## ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. OBJETIVOS .....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	14
3.2 CONDICIONES DE CULTIVO Y ESTRÉS.....	16
3.3 ANÁLISIS DE METABOLITOS: EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS INSTRUMENTAL .....	17
3.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS: PROCESAMIENTO DE LOS DATOS OBTENIDOS .....	17
3.5 AISLAMIENTO DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN.....	18
3.6 RT-QPCR.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
4.1 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS .....	22
4.2 EFECTOS DE LOS ELICITORES SOBRE LOS DIFERENTES FONDOS GENÉTICOS.....	22
4.2.1 Evaluación del metabolismo secundario de los mutantes relacionados con glucosinolatos .....	25
4.2.2 Evaluación del metabolismo secundario de los mutantes relacionados con SA y JA .....	30
4.2.2.1 Respuesta de los mutantes de señalización de SA y jasmonatos .....	30
4.2.2.2 Respuesta de los mutantes de biosíntesis de SA y jasmonatos .....	34
4.3 EFECTOS DE LOS ELICITORES SOBRE LOS GENES DE INTERÉS.....	37
5. CONCLUSIONES.....	40
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41

## Índice de tablas

<b>TABLA 1.</b> Detalle de los mutantes utilizados en el presente trabajo.....	<b>14</b>
<b>TABLA 2.</b> Genes diana y las secuencias de sus primers, que fueron seleccionados para evaluar sus niveles de expresión durante la exposición a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA.....	<b>21</b>
<b>TABLA 3.</b> Relación de los metabolitos identificados mediante UPLC, en la que se incorpora el tiempo de retención en minutos, la relación masa-carga y su fragmentación. ....	<b>23</b>

## Índice de figuras

<b>FIGURA 1.</b> Esquema del metabolismo vegetal.. .....	<b>7</b>
<b>FIGURA 2.</b> Vías propuestas para la biosíntesis y señalización del ácido salicílico y del ácido jasmónico.....	<b>10</b>
<b>FIGURA 3.</b> Representación esquemática de la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos e indólicos. ....	<b>11</b>
<b>FIGURA 4.</b> Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos indólicos y camalexina en los genotipos Col-0, <i>atr1D</i> , <i>cyp79b2/b3</i> y <i>qKO</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA.....	<b>25</b>
<b>FIGURA 5.</b> Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos alifáticos en los genotipos Col-0, <i>atr1D</i> , <i>cyp79b2/b3</i> y <i>qKO</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA .....	<b>27</b>
<b>FIGURA 6.</b> Cuantificación relativa de los niveles de JA y SA, algunos precursores y derivados, en los genotipos Col-0, <i>atr1D</i> , <i>cyp79b2/b3</i> y <i>qKO</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA. ....	<b>28</b>
<b>FIGURA 7.</b> Cuantificación relativa de los niveles de compuestos fenólicos en los genotipos Col-0, <i>atr1D</i> , <i>cyp79b2/b3</i> y <i>qKO</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA. ....	<b>29</b>
<b>FIGURA 8.</b> Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos indólicos y camalexina en los genotipos Col-0, <i>jai1</i> y <i>npr1</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA. ....	<b>30</b>
<b>FIGURA 9.</b> Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos alifáticos en los genotipos Col-0, <i>jai1</i> y <i>npr1</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA.. ....	<b>31</b>
<b>FIGURA 10.</b> Cuantificación relativa de los niveles de hormonas JA y SA, algunos precursores y derivados, en los genotipos Col-0, <i>jai1</i> y <i>npr1</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA.. ....	<b>32</b>
<b>FIGURA 11.</b> Cuantificación relativa de los niveles de compuestos fenólicos en los genotipos Col-0, <i>jai1</i> y <i>npr1</i> en respuesta a AgNO <sub>3</sub> , MeJA y SA.....	<b>33</b>

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

**FIGURA 12.** Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos indólicos y camalexina en los genotipos Col-0, *ics2* y *jar1* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>..... **34**

**FIGURA 13.** Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos alifáticos en los genotipos Col-0, *ics2* y *jar1* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

**FIGURA 14.** Cuantificación relativa de los niveles de hormonas, SA y derivados, en los genotipos Col-0, *ics2* y *jar1* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>..... **35**

**FIGURA 15.** Cuantificación relativa de los niveles de compuestos fenólicos en los genotipos Col-0, *ics2* y *jar1* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>..... **37**

**FIGURA 16.** Niveles de expresión relativos de genes relacionados con diversas rutas de señalización en Arabidopsis, en los genotipos Col-0, *atr1D*, *cyp79b2/b3* y *qKO* en respuesta AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA ..... **37**

## ABREVIATURAS

<b>1MeOI3M:</b> 1-metoxiindol-3-metil glucosinolato	<b>GNAs:</b> Glucosinolatos alifáticos
<b>4MTB:</b> 4-metiltiobutil glucosinolato	<b>GNIs:</b> Glucosinolatos indólicos
<b>4MeOI3M:</b> 1-metoxiindol-3-metil glucosinolato	<b>I3M:</b> indol-3-ilmetil glucosinolato
<b>5MTP:</b> 5-metiltiopentil glucosinolato	<b>IAOx:</b> Indol-3-acetaldoxima
<b>7MSH:</b> 7-metilsulfinilheptil glucosinolato	<b>JA:</b> Ácido jasmónico
<b>7MTH:</b> 7-metiltioheptil glucosinolato	<b>LC:</b> Cromatografía de Líquidos
<b>8MSO:</b> 8-metilsulfiniloctil glucosinolato	<b>LOX:</b> Lipoxigenasas
<b>8MTO:</b> 8-metiltiooctil glucosinolato	<b>MeJA:</b> Metil jasmonato
<b>GC:</b> Cromatografía de Gases	<b>MS:</b> Espectrometría de Masas
	<b>12-OPDA:</b> Ácido 12-oxo fitodienoico
	<b>PTFE:</b> Politetrafluoroetileno
	<b>UPLC:</b> Cromatografía Líquida de Alta Resolución
	<b>SA:</b> Ácido salicílico
	<b>SAGE:</b> Glicosil salicilato

### RESUMEN

Para hacer frente a las condiciones ambientales cambiantes, las plantas han desarrollado el llamado metabolismo secundario, cuya complejidad le otorga la capacidad de producir alrededor de 200.000 compuestos gracias a una gran variedad de rutas metabólicas diferentes. En el presente trabajo nos hemos centrado en aquellos metabolitos implicados en la defensa de la planta que, aunque su principal función no sea el crecimiento o el desarrollo, son necesarios para la supervivencia.

Teniendo en cuenta que, en la mayoría de los casos, el reajuste del metabolismo secundario va unido a la acción hormonal, lo más probable es que la regulación hormonal también pueda ser un factor importante en la acumulación de varios metabolitos, así como la presencia de estos compuestos podría influir en las rutas de señalización de estas hormonas de defensa.

Con el objetivo de responder a la hipótesis sobre la existencia de algún tipo de interacción entre estos metabolitos y las rutas de señalización hormonal del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), dos de las principales hormonas defensivas, se han integrado datos metabolómicos, obtenidos a partir del análisis del perfil cromatográfico de una selección de metabolitos secundarios, junto a los datos genéticos, derivados del estudio transcripcional en el ecotipo Columbia 0 (Col-0) y en diferentes mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*, metabolismo secundario, elicitores, hormonas, Glucosinolatos, oxilipinas, defensa, cromatografía, transcriptómica.

### ABSTRACT

Plants have developed secondary metabolism to fight against changing environmental conditions. Its complexity gives them the ability to produce around 200,000 compounds, because of the wide variety of different metabolic pathways. The present work focuses on those metabolites responsible for defence that, although their main function is not growth or development, are necessary for survival.

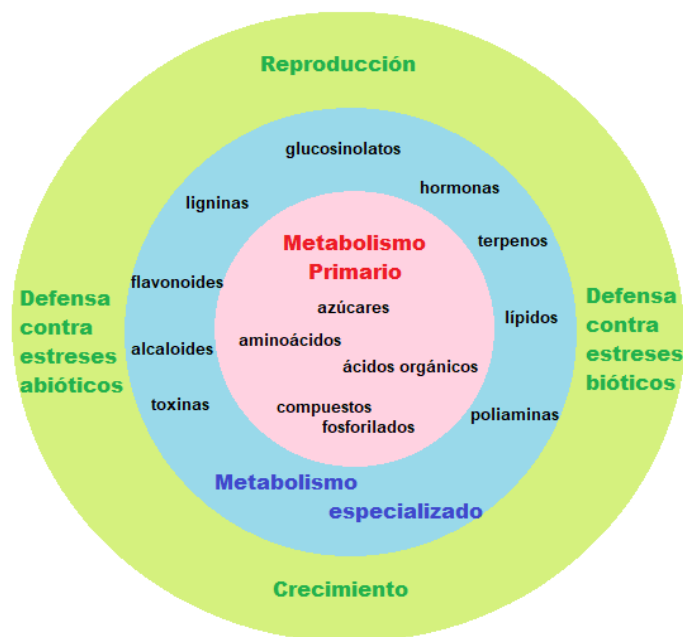
Given that the regulation of secondary metabolism is closely linked to hormonal action, it is most likely that hormonal regulation will also have some relevance in the accumulation of certain metabolites and at the same time the synthesis of these compounds could affect the signaling at the level of the defensive hormones.

To answer the hypothesis about the existence of some interaction between these metabolites and the hormonal signaling pathways of salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), the main defensive hormones, metabolomic data obtained from the analysis of the chromatographic profile of a selection of secondary metabolites were integrated together with the genetic data derived from the transcriptional study of ecotype Columbia 0 (Col-0) and different hormonal mutants of *Arabidopsis thaliana*.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, secondary metabolism, elicitors, hormones, glucosinolates, oxylipins, defence, chromatography, transcriptomics.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han evolucionado hasta desarrollar complejos mecanismos metabólicos y genéticos de detección y transducción de señales en su sistema celular para hacer frente a situaciones ambientales adversas (Gill y Tuteja, 2010), que afectan a distintos mecanismos fisiológicos y celulares provocando una reducción en su crecimiento y productividad (Meena *et al.*, 2017; Foyer y Noctor, 2005). En este sentido, es necesaria la actuación conjunta de estos múltiples complejos para dar lugar a las señales celulares que permiten a las plantas la adaptación al estrés y les otorgan las aptitudes defensivas necesarias contra los patógenos (Ng *et al.*, 2018; Lindemose *et al.*, 2013). Una de estas virtudes adaptativas de las plantas que les sirven para hacer frente a distintos factores adversos es la capacidad de modular el metabolismo para sintetizar distintos compuestos con capacidad defensiva (Erb y Kliebenstein, 2020; Isah, 2019).



*Figura 1. Esquema del metabolismo vegetal.* Los compuestos especializados del metabolismo secundario (azul) llevarían a cabo varias funciones (verde) utilizando los metabolitos primarios centrales (rosa) como bloques de construcción (Castro-Moretti *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, los compuestos sintetizados por las plantas se han separado, según su función y concentración, en metabolitos primarios y secundarios (Pott *et al.*, 2019). Los primeros, entendidos como los que forman el eje central de las reacciones bioquímicas y que se mantienen en la mayoría de las especies, sirven para mantener el



## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

crecimiento y desarrollo de las plantas, pero además algunos de estos metabolitos de las rutas metabólicas primarias, como la glucólisis o el ciclo del ácido tricarboxílico, también sirven como componentes básicos de las rutas secundarias, por ejemplo los aminoácidos, presentes en la asimilación de nitrógeno también son precursores de varios compuestos especializados, que incluyen hormonas y pigmentos (Castro-Moretti *et al.*, 2020; Erb y Kliebenstein, 2020; Pott *et al.*, 2019). En cambio, los metabolitos secundarios son aquellos que quedarían fuera de ese núcleo de reacciones y cuya función es mejorar el crecimiento y la supervivencia de las plantas en condiciones adversas (Figura 1; Castro-Moretti *et al.*, 2020; Khare *et al.*, 2020; Erb y Reymond, 2020; Yang *et al.*, 2018; Zandalinas *et al.*, 2017). No obstante, según Isah (2019), la alta diversidad de productos secundarios guarda relación con su función ecológica: la protección frente a herbívoros, bacterias, hongos, virus e incluso contra individuos competidores, señales de comunicación con microorganismos simbióticos o para atraer polinizadores y dispersores de semillas (Erb y Kliebenstein, 2020; Yang *et al.*, 2018; Wink, 2016).

Entre estos metabolitos secundarios, encontramos las llamadas hormonas vegetales que son un grupo de vital importancia para la supervivencia de las plantas. Según varios autores, se trata de moléculas orgánicas de tamaño reducido, requeridas en bajas concentraciones y cuyas funciones van desde la regulación del crecimiento, el desarrollo y la reproducción hasta la coordinación de las respuestas inmunes (Berens *et al.*, 2017; Shigenaga y Argueso, 2016; Huot *et al.*, 2014). Dentro de este grupo existen diferentes subconjuntos, entre los que destacan dos de ellos por estar considerados como reguladores positivos de la defensa frente a diferentes condiciones de estrés, son el ácido jasmónico (JA) y sus derivados nombrados como jasmonatos (JAs) y el ácido salicílico (SA) (Berens *et al.*, 2017). Sin embargo, según Pieterse *et al.* (2012), las vías de señalización mediadas JAs y SA son generalmente antagónicas entre sí, lo que supone que la activación de la ruta de señalización de una puede suprimir a la otra. En el entorno natural esto no siempre es negativo, ya que las plantas a menudo se enfrentan a múltiples problemas ambientales que ocurren de forma simultánea o secuencial, por lo que esta interacción cruzada de JA-SA puede ayudar a integrar el contexto ecológico y preparar a una planta frente a futuras problemáticas (Huot *et al.*, 2014; Pieterse *et al.*, 2012).

En *A. thaliana*, la ruta de biosíntesis de los jasmonatos comienza con el ácido linolénico, el cual es liberado de los fosfolípidos procedentes de las membranas del cloroplasto por la acción de fosfolipasas (PLA<sub>1</sub>). Este ácido linolénico se convierte tras

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

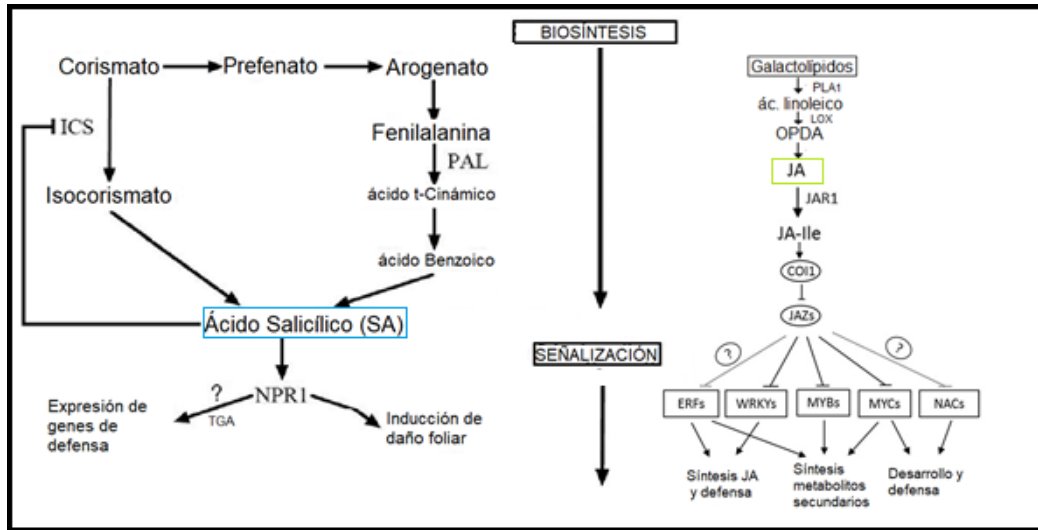
varias reacciones de reducción y oxigenación mediadas por lipoxigenasas (LOX) en ácido 12-oxofitodienoico (12-OPDA), que pasa a ser reducido y transportado hasta el peroxisoma dónde se metaboliza a JA o puede quedar esterificado y funcionar como reserva de 12-OPDA, en forma de arabidópsido (Wasternack y Hause, 2013). Ya en el citoplasma, una jasmonoil-isoleucina sintetasa (JAR1) se encarga de formar el conjugado del JA con isoleucina (JA-Ile), que se conoce como la forma bioactiva endógena más potente de JAs (Wasternack y Hause, 2013; Suza y Staswick, 2008).

En condiciones de estrés, según Santner y Estelle, (2007), es cuando se induce la producción de este compuesto que se une a la proteína COI1, iniciándose así la señalización mediada por jasmonatos. COI1 es un componente del complejo SCF E3 ubiquitin ligasa, que media la ubiquitinación y degradación proteasomal de las proteínas “JAsmonate Zim-domain” (JAZ), que reprimen la expresión de genes dependientes de jasmonatos mediante el bloqueo de sitios de unión de factores de transcripción vinculados a la respuesta mediada por JAs (Wasternack y Hause, 2013; Santner y Estelle, 2007). Entre otros, el factor de transcripción más estudiado y conocido es el denominado JAI1 (“JAsmonate Insensitive 1”)/MYC2, el cual es un regulador positivo de la ruta de señalización por jasmonatos (Berens *et al.*, 2017; Wasternack y Hause, 2013; Santner y Estelle, 2007; Lorenzo *et al.*, 2004).

Otro regulador importante en las respuestas de las plantas al ataque de patógenos es el ácido salicílico (SA), el cual es sintetizado a través de dos vías diferentes en las plantas (Figura 2): la vía de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y la vía del isocorismato (IC) utilizando corismato, el producto final de la vía del shikimato como precursor (Lefevre *et al.*, 2020; Berens *et al.*, 2017). En Arabidopsis, la vía de IC es la más importante, iniciándose cuando el corismato se convierte en isocorismato mediante la reacción catalizada por la isocorismato sintasa (ICS1 e ICS2) (Lefevre *et al.*, 2020; Dempsey *et al.*, 2011). La señalización mediada por SA depende de su interacción con el receptor NPR1 (“Non-expressor of Pathogenesis-Related proteins 1”) que en ausencia de hormona se encuentra en forma de oligómero. La acumulación e interacción del SA con este complejo provoca la liberación de monómeros NPR1, que se trasladan al núcleo y activan la expresión de genes de defensa a través de la interacción física con factores de

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

transcripción tipo TGA, que se unen a los promotores de genes relacionados con patogénesis (PR), para activar así su expresión (Huot *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2012).



**Figura 2. Vías propuestas para la biosíntesis y señalización del ácido salicílico y del ácido jasmónico.** Se muestran las dos vías para la biosíntesis del SA en las plantas. El marcador de pregunta indica la existencia de una probable proteína adaptadora que aún no está identificada (Adaptado de Ruan *et al.*, 2019 y Tamaoki, 2008).

Además de estas hormonas, nos encontramos otros metabolitos vegetales secundarios que desempeñan funciones biológicas importantes relacionadas también con la defensa frente a amenazas ambientales y que son característicos de la familia Brassicaceae, son los llamados glucosinolatos (Chhajed *et al.*, 2020; Harun *et al.*, 2020; Mitreiter y Gigolashvili, 2020). Estas moléculas, que contienen azufre y nitrógeno, son portadoras de un grupo hidroxiamino sulfato y un residuo  $\beta$ -tioglucósido unido a una cadena lateral de tamaño variable, que depende del aminoácido del que se deriva, lo que determina una diversidad química de aproximadamente 130 glucosinolatos (Chhajed *et al.*, 2020; Mitreiter y Gigolashvili, 2020; Zandalinas *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta el aminoácido precursor, se pueden clasificar en glucosinolatos aromáticos (derivados de la fenilalanina o tirosina), glucosinolatos alifáticos o GNAs (derivados de la alanina, isoleucina, leucina, metionina o valina) y los glucosinolatos indólicos o GNIs (derivados del triptófano, también precursor de otros compuestos como camalexina o auxinas) (Harun *et al.*, 2020; Mitreiter y Gigolashvili, 2020). Su regulación es muy compleja y depende de una gran variedad de procesos diferentes. Sin embargo, el núcleo de control de los glucosinolatos se ejerce mediante determinados factores de transcripción que

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

controlan la maquinaria transcripcional (Figura 3), los cuales son controlados en gran medida a través de las ya mencionadas hormonas vegetales, en particular por aquellas involucradas en la señalización del ataque biótico y el estrés abiótico (Mitreiter y Gigolashvili, 2020; Augustine y Bisht, 2015).

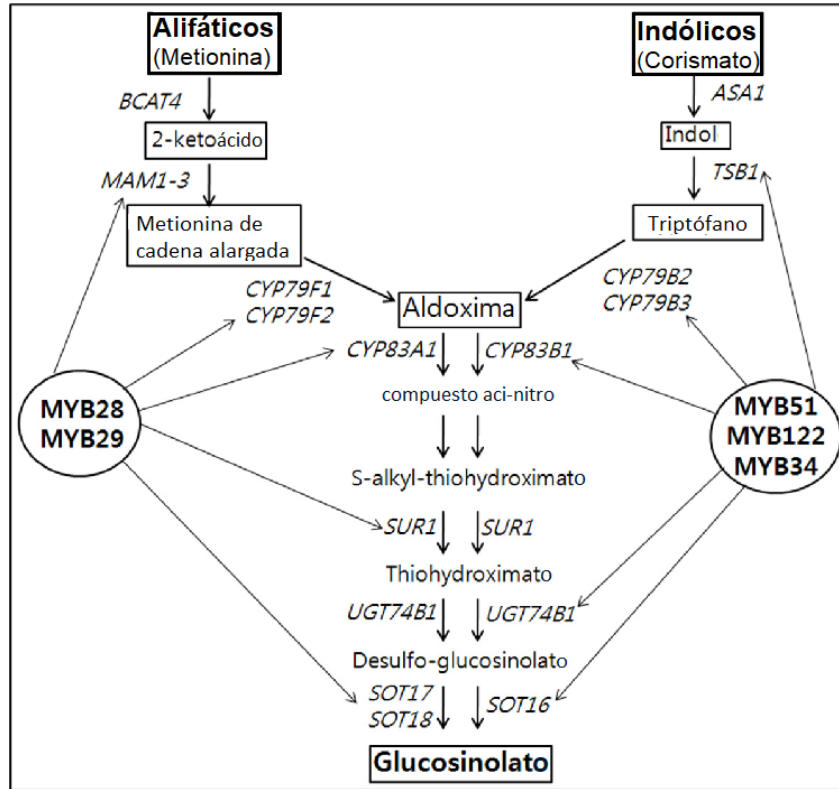


Figura 3. Representación esquemática de la biosíntesis de glucosinolatos alifáticos e indólicos. (Adaptado de Kim et al., (2013).

Finalmente, tenemos la ruta de los fenilpropanoides involucrada en la producción de ácidos fenólicos, monolignoles, estilbenos o cumarinas, compuestos que están directa e indirectamente involucrados en el desarrollo de las plantas y la respuesta al estrés (Yadav *et al.*, 2020; Dixon *et al.*, 2002). En este sentido, se han realizado numerosos estudios donde los genes relacionados con las vías de señalización y de síntesis de los fenilpropanoides se encuentran altamente expresados en condiciones de estrés biótico y abiótico (Yadav *et al.*, 2020). Por ejemplo, el tratamiento con SA provoca la acumulación de compuestos fenólicos, pero también un incremento en la actividad de la enzima PAL (Ghamari *et al.*, 2019). Estos compuestos también mantienen una conexión con los glucosinolatos, en concreto existe cierto antagonismo entre las vías de regulación de glucosinolatos y de fenilpropanoides (Zhang *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2019). Concretamente, varios estudios bioquímicos y genéticos han establecido que la

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

acumulación de aldoximas, producto de la reacción del aminoácido en la ruta de los glucosinolatos (Figura 3) impacta negativamente sobre la vía de los fenilpropanoides (Zhang *et al.*, 2020; Kliebenstein *et al.*, 2005; Hemm *et al.*, 2002).

Para poder cuantificar estos metabolitos y sus posibles interacciones, en respuesta a unas condiciones ambientales concretas o a un tratamiento elicitor químico o físico, se requieren técnicas analíticas de alta resolución. Dichas técnicas se reúnen bajo el nombre de metabolómica, donde podemos encontrar las llamadas técnicas dirigidas (basadas en el análisis de un número fijo de compuestos, generalmente conocidos y de los que se dispone de estándares puros), y las no dirigidas (con el objetivo es evaluar los cambios metabólicos a nivel global sin una idea *a priori* del efecto concreto) (Arbona *et al.*, 2010; 2009). Este proceso, conocido como perfilado metabolómico, se basa en el estudio de grupos de compuestos con propiedades químicas comunes y para ello se emplean las técnicas basadas en cromatografía de gases (GC) o líquida (LC), según la naturaleza gaseosa o soluble respectivamente, acopladas a espectrometría de masas (MS) que, aparte de ser altamente sensible y específica, proporciona información útil para la identificación de compuestos desconocidos (Lee *et al.*, 2012; Arbona *et al.*, 2009; 2013).

Por otro lado, también resulta interesante hacer uso de las tecnologías emergentes de secuenciación de siguiente generación (NGS), como por ejemplo el RNA-Seq, que permite el análisis de la expresión diferencial de genes a través de todo el genoma u otras plataformas como la RT-qPCR que es extremadamente precisa, aunque permite analizar sólo un número limitado de genes (Steibel *et al.*, 2009). Con esta técnica, se puede realizar una cuantificación relativa de la expresión de un gen diana en dos o más condiciones experimentales, normalizadas con la expresión relativa de un gen control, para comprobar si determinadas condiciones ambientales están afectando o no a nuestros genes de interés (Steibel *et al.*, 2009). Estas técnicas y algunas otras se engloban en lo que se conoce como la transcriptómica, un tipo de análisis que representa probablemente uno de los campos más desarrollados actualmente, ya que puede proporcionar conocimientos más amplios y profundos sobre las redes de regulación de numerosos genes y sobre la gran cantidad de rutas de señalización biológicas que gobiernan a un organismo (Steibel *et al.*, 2009).

## 2. OBJETIVOS

La regulación del metabolismo secundario está íntimamente ligada a la acción hormonal de hormonas como los JAs y del SA, cuyo papel en la defensa de plantas frente a plagas y enfermedades, así como condiciones de carácter abiótico ha sido ya ampliamente estudiado. En este contexto, parece lógico pensar que no solo la regulación hormonal tendrá alguna relevancia en la acumulación de determinados metabolitos, sino que la síntesis de dichos compuestos podría afectar a la señalización a nivel de estas hormonas defensivas, aunque esto no ha sido estudiado en detalle ni demostrado. Actualmente, los avances tecnológicos en la combinación de análisis transcriptómicos y metabolómicos han sido capaces de proporcionar diversos enfoques posibles para encontrar las características moleculares involucradas en el reajuste de la expresión génica y las vías metabólicas. De este modo, integrando el uso de análisis genéticos y de metabolitos involucrados en la regulación de tolerancia al estrés, el objetivo principal del presente trabajo es responder a la hipótesis de **si existe algún tipo de interacción entre la síntesis y acumulación de glucosinolatos y las rutas de señalización hormonal dependientes de jasmonatos y SA ante la presencia de compuestos elicitores**. Además, como objetivos secundarios se pretenderá:

- Caracterizar la respuesta metabólica y hormonal en mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la producción de glucosinolatos indólicos y/o alifáticos.
- Comprobar la relación entre tratamientos, regulación hormonal y producción de metabolitos secundarios en líneas deficientes en la señalización o producción de SA o jasmonatos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

En el presente trabajo se utilizaron los mutantes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh en el ecotipo Columbia-0 (Col-0) que se mencionan en la Tabla 1, obtenidos del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) o bien pedido a los autores que los identificaron.

Tabla 1. Detalle de los mutantes utilizados en el presente trabajo.

Nombre	Descripción	AGI	Código	Referencia
<i>atr1D</i>	35S::ATR1	At5g60890	-	Bender and Fink 1998
<i>cyp79b2</i> <i>cyp79b3</i>	Doble mutante ADN-T	At4g39950 At2g22330	SALK_130570 SAIL_56_E07	Zhao <i>et al.</i> 2002
<i>qKO</i> ( <i>cyp79b2</i> <i>cyp79b3</i> <i>myb29</i> <i>myb28</i> )	Cuádruple mutante ADN-T	At4g39950 At2g22330 At5g61420 At5g07690	SALK_130570 SAIL_56_E07 SALK_136312 GABI_868E02	Sønderby <i>et al.</i> 2007
<i>jai1-1/</i> <i>jini1-2</i>	Cambio W194Stop	At1g32640	-	Lorenzo <i>et al.</i> 2004
<i>npr1</i>	Sustitución H334Y	At1g64280	SALK_203386	Cao <i>et al.</i> 1994, Cao <i>et al.</i> 1997
<i>ics2</i>	Inserción ADN-T	At1g18870	SALK_084635	Garcion <i>et al.</i> 2008
<i>jar1</i>	Sustitución S101F	At2g46370	-	Staswick <i>et al.</i> 1992

El mutante *atr1D* (“*altered tryptophan regulation*”) (Tabla 1), posee una mutación dominante que incrementa los niveles de expresión del gen ATR1, el primer regulador de triptófano caracterizado en plantas. Este gen codifica para un factor de transcripción de tipo MYB, que modula la expresión del primer gen en la ruta, ASA1, que funciona como un punto de control para regular la homeostasis de los glucosinolatos indólicos. El fenotipo mutante presenta, de este modo, una elevada acumulación de glucosinolatos

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

indólicos y otros compuestos, como la camalexina (Bender y Fink 1998, Celeza *et al.*, 2005).

El doble mutante *cyp79b2 cyp79b3* ("*Cytochrome P450*" (Tabla1)), es un mutante de pérdida de función de las actividades codificadas por los genes CYP79B2 y CYP79B3, que son capaces de convertir el triptófano (Trp) en indol-3-acetaldoxima (IAOx) *in vitro*, pero cuya función primaria es la de promover la biosíntesis de glucosinolatos indólicos llamados MYB28 y MYB29. El fenotipo mutante presenta, así, niveles muy reducidos de glucosinolatos indólicos y camalexina (Mikkelsen *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2002).

El cuádruple mutante *qKO* (*cyp79b2 cyp79b3 myb28 myb29*) (Tabla1), que comparte fenotipo con el mutante anterior, presenta la pérdida de función de los genes que codifican para los citocromos CYP79B2 y CYP79B3 y también para dos factores de transcripción que regulan la biosíntesis de glucosinolatos de tipo alifático denominados MYB28 y MYB29. El fenotipo mutante da como resultado una reducción muy marcada tanto en los niveles de glucosinolatos indólicos, como alifáticos, así como en otros productos asociados (ej. Camalexina) (Sønderby *et al.*, 2007, Sun *et al.* 2009).

El mutante *jai1-1/jin1-2* ("*jasmonate-insensitive 1*") (Tabla 1), es un mutante de pérdida de función del gen MYC2 que codifica para este factor de transcripción que es el elemento clave en la regulación de la transcripción de genes de respuesta a JA, o de sus otras formas (metil jasmonato, MeJA, o jasmonoil isoleucina, JA-Ile), lo que la hace insensible a este, ya sea exógeno o endógeno (Lorenzo *et al.*, 2004).

El mutante *npr1* ("*nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*") (Tabla 1), es un mutante de pérdida de función del gen NPR1 que codifica la proteína NPR1, la cual actúa como receptor del SA en la ruta de señalización. El genotipo mutante resulta ser, así pues, insensible al SA, bien exógeno o endógeno (Cao *et al.*, 1994).

El mutante *ics2* ("*isochorismate-synthase 2*") (Tabla 1), es un mutante de pérdida de función del gen ICS2 que participa en la ruta de biosíntesis del SA en los plástidos. De este modo, el fenotipo del mutante presenta una reducción en los niveles endógenos de SA y, con ello, una regulación a la baja en su ruta de señalización (Garcion *et al.*, 2008).

El mutante *jar1* ("*jasmonate-resistant 1*") (Tabla 1), es un mutante de pérdida de función del gen JAR1, cuyo producto codifica la actividad enzimática responsable de



## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

conjugar el ácido jasmónico (JA) con isoleucina dando lugar a JA-Ile, la forma activa de los jasmonatos (Staswick y Tiryaki, 2004). Así pues, el fenotipo mutante resultará en una regulación negativa en su ruta de señalización, aunque se mantienen los niveles endógenos de JA (Staswick *et al.*, 1992, Suza y Staswick, 2008).

### 3.2 Condiciones de cultivo y estrés

Las semillas de *Arabidopsis* se germinaron en jiffy pellets (Jiffy Products España S.L.U. Murcia, España) en una cámara de crecimiento con 8h de iluminación a 21°C y 16h de oscuridad a 18°C, con un 70% de humedad relativa. Tras 10 días, las plántulas se trasplantaron a jiffy individuales para facilitar la separación en los diferentes grupos al ser sometidas a los tratamientos con las soluciones elicitoras preparadas mediante la disolución del compuesto (AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA) en agua destilada hasta alcanzar la concentración deseada.

En cada experimento, las plantas se dejaron crecer durante 6 semanas y luego se distribuyeron de forma aleatoria según cada tratamiento: H<sub>2</sub>O, AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. A continuación, se describe la composición de genotipos de cada experimento:

- 1) El primer experimento se emplearon plantas de los genotipos Col-0, *atr1D*, *cyp79b2 cyp79b3* y *qKO*. Cada grupo de plantas se roció con una solución de AgNO<sub>3</sub> a una concentración de 5 mM, una solución de MeJA a 500 µM, una solución 100 µM de SA o agua destilada como control (CT):
- 2) En el segundo experimento se emplearon por un lado (i) plantas de los genotipos Col-0, *jail* y *npr1*, las cuales fueron rociadas con una solución 5 mM de AgNO<sub>3</sub>, una solución 500 µM de MeJA, una solución 100 µM de SA o agua como control (CT) y, por otro, (ii) plantas de los genotipos Col-0, *ics2* y *jar1* que se rociaron únicamente con una solución 5 mM de AgNO<sub>3</sub> o con agua como control (CT).

Pasadas 24h desde la aplicación de cada tratamiento, se recolectaron las plantas completas desde la roseta basal y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente el material vegetal se molió con mortero para conseguir un polvo fino y todas las muestras se almacenaron en el congelador a -80°C hasta su futuro análisis.

### 3.3 Análisis de metabolitos: extracción y análisis instrumental

Para la extracción de metabolitos, las muestras se procesaron tal y como se indica en Zandalinas *et al.* (2012). De forma resumida, a 50 mg de tejido molido se le añadieron 500 µL de una solución de metanol:agua en proporción 80:20 con 1 mg/L de biochanina A (5,7-dihidroxi-4'-metoxiisoflavona, Sigma-Aldrich, Madrid, España) como estándar interno, para después poder calcular el área normalizada por gramo de muestra. A continuación, las muestras se colocaron 10 minutos en el baño de ultrasonidos (Elmasonic, Singen, Alemania) y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C (MPW-65R, MPW Med Instruments, Varsovia, Polonia). Antes de su inyección en el equipo de UPLC, los extractos fueron filtrados a través de filtros de PTFE, con tamaño de poro de 0.2 µm (Acefesa, Barcelona, España) y diluidos 1:4 en una solución acuosa del metanol al 80%. Además de los viales con las muestras para analizar, también fueron elaborados los blancos de procedimiento, únicamente con la solución de extracción igualmente diluida 1:4.

Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución (UPLC, Acquity SDS System, Waters, Milford, MA, E.E.U.U.). En la separación cromatográfica se empleó una columna C18 de fase reversa (Luna Omega C18 Polar 1.6 µm, 100 x 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Se eligió este relleno de fase estacionaria debido al carácter semipolar de los analitos. Como fase móvil se emplearon agua y acetonitrilo calidad HPLC (Panreac, Barcelona, España) suplementados con ácido fórmico al 0.1% (v/v) a un flujo de 0.3 mL/min. Durante los análisis la columna se mantuvo a 40°C para facilitar la separación de analitos y las muestras a 10°C para mantener su estabilidad durante el tiempo que duren las medidas.

### 3.4 Identificación de los metabolitos: procesamiento de los datos obtenidos

En la realización del análisis no dirigido, los archivos generados se transformaron al formato netCDF utilizando la aplicación databridge del paquete MassLynx (Micromass Ltd. RU). Una vez obtenidos los datos, tal y como aparece en Smith *et al.*, (2006), se adquirieron las señales cromatográficas empleando el software xcms en el entorno R, obtenido de biconductor ([doi:10.18129/B9.bioc.xcms](https://doi.org/10.18129/B9.bioc.xcms)), tras lo cual se procedió a procesar los datos para realizar los análisis estadísticos y las cuantificaciones relativas.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

Este proceso se puede separar en tres partes:

- 1) La captura de los picos. Con el algoritmo `matchedFilter` (Smith *et al.*, 2006) se genera un fichero donde se guardan las listas de los picos, su intensidad y el tiempo de retención de forma secuencial.
- 2) Alineamiento y corrección de los tiempos de retención. A continuación, los picos se agrupan en función de sus tiempos. Para ello, el algoritmo calcula la mediana del tiempo de retención y su desviación para cada muestra dentro del grupo.
- 3) El paquete CAMERA (doi:10.18129/B9.bioc.CAMERA) (Kuhl *et al.* 2012) permite la agrupación de todos los picos cromatográficos correspondientes a una misma molécula y además proporciona la anotación para cada uno de los picos (aductos, fragmentos, pérdidas neutrales, etc.). Lo cual facilita su posterior identificación.

Previo a cualquier análisis estadístico, se procedió a la normalización de los resultados. Para ello, el área de cada pico se dividió por el área del estándar interno ( $A_{\text{análito}}/A_{\text{IS}}$ ) para cada muestra y el valor resultante se dividió entre la cantidad de tejido empleada en cada caso, expresada en gramos. De este modo, la medida empleada para cada metabolito se expresó como unidades (u) por gramo de muestra (g).

Para el análisis estadístico se realizó un análisis ANOVA de dos vías, empleando como factores tratamiento y genotipo, se aplicó el análisis posthoc Tuckey HSD para realizar múltiples comparaciones por pares entre las medias de los grupos. Diferencias con un  $P \leq 0.05$  se consideraron significativas.

Los conjuntos de picos cromatográficos que presentaron diferencias significativas en alguno de los factores se emplearon para anotar los metabolitos, tal y como se explica en la sección 4.1 de los Resultados y Discusión.

### 3.5 Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total se realizó utilizando material vegetal del primer experimento (Sección 3.2) empleando el mini Kit RNeasy para plantas de QIAGEN (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA), con algunas modificaciones: 50 mg de muestra fueron incubadas con el tampón de extracción suplementado con  $\beta$ -mercaptoetanol a 56°C

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

durante 1 minuto utilizando el termobloque, para facilitar la disgregación del tejido y la desnaturalización proteica. Finalmente, en el último paso, se dejó reposar el ARN resuspendido en agua con dietil pirocarbonato (DEPC) durante unos dos minutos. El rendimiento y la calidad del ARN se evaluó mediante una cuantificación de la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Madrid, USA), evaluándose tanto la concentración de ARN como las relaciones 260/280 y 260/230 nm.

El protocolo utilizado para la retrotranscripción de ARN a ADNc fue el recomendado por TAKARA para su kit PrimeScript™ RT (TAKARA Bio Europe S.A.A.). Brevemente, 2 µg de ARN total fue incubado con ADNasa para eliminar los restos de ADN genómico. Posteriormente se añadieron los componentes del kit que contienen primers Oligo dT y otros primers, que son mezclas de desoxirribonucleótidos compuestas por secuencias aleatorias de 6 nucleótidos (hasta 4<sup>6</sup> secuencias diferentes) y un extremo 5' fosforilado para asegurar el proceso de transcripción, e incluye una transcriptasa inversa. Para comprobar la calidad del ADNc obtenido, y además testear los primers específicos diseñados, se realizó una PCR prueba en un termociclador Applied Biosystems™ SimpliAmp™ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Madrid, USA) cuyos resultados se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v) para algunos de los genes a analizar mediante RT-qPCR (PR1, PDF1-2 y ORA59; Tabla 2). El resultado de la electroforesis se visualizó en el sistema de imagen molecular automático ImageQuant® LAS 500 (GE Healthcare, Madrid, USA), mediante la opción de fluorescencia integrada. Finalmente, los ADNc se conservaron a -80°C hasta su análisis.

### 3.6 RT-qPCR

Para la cuantificación transcripcional, a cada reacción se le añadieron 5 µL de la mezcla SYBR Green Máster Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific, Inc., Madrid, USA), 1 µl de una mezcla de primers (directo e inverso) específicos del gen diana a una concentración de 10 µM (Tabla 1) y 1 µl del ADNc, sintetizado a partir de 2 µg de ARN, para un volumen final de 10 µl, salvo en los controles negativos donde se sustituyó el ADNc por 1 µl de agua. El marcador fluorescente SYBR se intercala en el ADN de doble cadena durante cada ciclo de la PCR incrementando la emisión fluorescente, lo que

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

permite el seguimiento de la evolución de la amplificación y, de esta manera, cuantificar la expresión génica.

Para llevar a cabo el diseño de los primers utilizados, una vez obtenidas las secuencias CDS a partir de la herramienta online TAIR (“The Arabidopsis Information Resource”), se procedió a su diseño mediante el uso de la herramienta online “Primer3Plus” (Untergasser *et al.*, 2012) cumpliendo unas condiciones básicas: una cantidad de GC entre el 50% y 60%, temperaturas de alineamiento de 60°C y cuya secuencia no favorezca la formación de horquillas (hairpins) o la formación de híbridos por complementariedad entre ellos y que generen un amplicon con un tamaño entre 100 y 150 nt (Tabla 2).

Todas las RT-qPCR se llevaron a cabo usando un termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) con las siguientes condiciones: 10 min a 95°C; 40 ciclos que constan de 10 s a 95°C, 10 s a 60°C y 20 s a 72°C; y una fase de disociación (o “melting”) de 10 s a 60°C y 15 s a 95°C en continuo, para comprobar la especificidad de la amplificación. Se analizaron las tres réplicas biológicas y cada una de ellas fue realizada por duplicado como réplicas técnicas. Para calcular los niveles de expresión génica relativa, los datos se extrajeron mediante el software StepOne™ v2.3, fueron tratados con la herramienta de cálculo REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

Tabla 2. Genes diana y las secuencias de sus primers, que fueron seleccionados para evaluar sus niveles de expresión durante la exposición a AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA.

<b>Cód. AGI</b>	<b>Gen</b>	<b>Primer directo</b>	<b>Primer reverso</b>	<b>Referencia</b>
<i>AT2G14610</i>	PR1	CGTCTTTGTAGCTCTTGTAGGTGC	TGCCTGGTTGTGAACCCTTAG	Antignani <i>et al.</i> , 2015
<i>AT1G06160</i>	ORA59	GGCTCTCGCTTATGATCAGG	GGACGGTTTCTCATGGAGTG	Rehrig <i>et al.</i> , 2014
<i>AT5G44420</i>	PDF1.2	TTGCTGCTTTCGACGCACCGG	TAGATTTAACATGGGACGTAACAG	Rehrig <i>et al.</i> , 2014
<i>AT4G39950</i>	CYP79B2	GCCGGATATCACATCCCTAAAG	CCCGGTACTGAACGAGATAAAC	Elaboración propia
<i>AT4G13770</i>	CYP83A1	TGTGGCCACCTTTAAGCATG	TGTACTTCTTCCCGAACGCT	Elaboración propia
<i>AT1G18570</i>	MYB51	TGTTCTTCGTCCACGTTCTC	ACACAAGACTCCTCCAACATC	Elaboración propia
<i>AT5G60890</i>	MYB34/ATR1	AAAATGGCGGCAACATCAGT	TTTCAATAACTCCGGCGCTG	Elaboración propia
<i>AT5G07690</i>	MYB29	GTGTACGAGACACCGAAATATGA	ACATGAAGACAACGGTGTAGAG	Elaboración propia
<b>Gen normalizador</b>				
<i>AT5G09810</i>	ACTIN7	AGGGAGAAGATGACTCAGATC	GTGTGAGACACA CCATCACC	Xu <i>et al.</i> , 2017

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Identificación de metabolitos

La identificación de metabolitos se realizó gracias a la comparación de los espectros de masas y sus patrones de fragmentación obtenidos en los análisis UPLC/ESI-QTOF-MS con la estructura química de los analitos previamente identificados o disponibles en bases de datos (Massbank, metlin o HMDB), encontrados en diferentes referencias bibliográficas, como en el caso de Glauser *et al.*, (2012) y Zandalinas *et al.*, (2012). Por ejemplo, en el patrón de fragmentación de casi todos los glucosinolatos (Tabla 3), se puede detectar la presencia de un ión característico a 96.96 m/z, correspondiente al anión bisulfato ( $\text{HSO}_4^-$ ) liberado después de su disociación, inducida por el proceso de ionización (“*in source dissociation*”). De este modo, los fragmentos de una molécula liberados tras la colisión generan un patrón único en el espectro de masas gracias al cual se pueden identificar dichas moléculas.

Como se puede observar en la Tabla 3, un total de 23 metabolitos pudieron ser identificados y clasificados en los siguientes grupos: **compuestos fenólicos** (formas *cis* y *trans* de la coumaroilagmatina, SA y su forma glucosilada, sinapoil glucosa y sinapoil malato), **oxilipinas** (JA, 12-OPDA, dnOPDA y JA-ile) y, finalmente, **glucosinolatos y otros compuestos relacionados** (indólicos y alifáticos, camalexina y su precursor el ácido dihidroxicamaléxico o DHCA).

### 4.2 Efectos de los elicitores sobre los diferentes fondos genéticos

A continuación, se evaluó el impacto provocado por los tratamientos de estrés sobre los metabolitos identificados en el apartado anterior para cada uno de los experimentos. De este modo, se pretendió evaluar la hipótesis principal de este proyecto, en la que se plantea la existencia de algún tipo de interacción entre estos metabolitos y las rutas de señalización hormonal.

Tabla 3. Relación de los metabolitos identificados mediante UPLC, en la que se incorpora el tiempo de retención en minutos, la relación masa-carga y su fragmentación. El método de ordenación corresponde a un sistema de agrupación basado en su naturaleza química. En la última columna, se han destacado en negrita los iones cuantificadores.

Nombre	Fórmula	Ionización	Retención (min.)	Precursor	m/z fragmentación
<i>COMPUESTOS FENÓLICOS</i>					
<b>t- cumaroilagmatina</b>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6.01	277.17	<b>277</b> , 147, 119
<b>c- cumaroilagmatina</b>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	6.89	277.17	<b>277</b> , 147, 119, 102
<b>Sinapoil Glucosa</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	7.19	387.12	<b>387</b> , 225, 207, 177
<b>Sinapoil Malato</b>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	8.42	341.08	<b>341</b> , 323, 207
<b>SA (Ácido salicílico)</b>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	9.07	137.02	<b>137</b> , 93
<b>SAGE (Glicosil salicilato)</b>	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	5.89	299.08	<b>299</b> , 137, 119, 93
<b>Escopolina (2H-1-Benzopiran-2-ona, 7- (β-D-glucopiranosiloxi) -6-metoxi-)</b>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	4,80	395,12	<b>395</b> , 193
<b>Escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicromen-2-ona)</b>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	5,62	193,05	<b>193</b>
<i>OXIPILINAS</i>					
<b>JA (Ácido jasmónico)</b>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	10.79	209.11	<b>209</b> , 193, 151, 133
<b>12OPDA (Ácido 12-oxo fitodienoico)</b>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	10,37	291,19	<b>291</b> , 265
<b>DnOPDA (Ácido dinor-12-oxo-fitodienoico)</b>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	[M + H] <sup>+</sup>	10,93	265,18	<b>265</b>
<b>JA-ile</b>	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>4</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	8,39	322,20	<b>322</b> , 266
<i>ESTÁNDAR INTERNO</i>					
<b>Biochanina A (5,7-dihidroxi-4-metoxiisoflavona)</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M – H] <sup>–</sup> / [M + H] <sup>+</sup>	12.96/12.96	283.07/285.07	<b>283</b> , 270, 242, 213/ <b>285</b> , 268, 239, 211



Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

Nombre	Fórmula	Ionización	Retención (min.)	Precursor	m/z fragmentación
<i>GLUCOSINOLATOS INDÓLICOS Y COMPUESTOS RELACIONADOS</i>					
<b>I3M (indol-3-ilmetil glucosinolato)</b>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	4.89	447.06	<b>447</b> , 96
<b>4-MeO-I3M (4-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato)</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	7.03	477.06	<b>477</b> , 96
<b>1-MeO-I3M (1-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato)</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	7.73	477.06	<b>477</b> , 44, 96
<b>Camalexina (3-(1,3-thiazol-2-yl)-1H-indol)</b>	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S	[M + H] <sup>+</sup>	11.08	201.05	<b>201</b> , 174, 160, 142, 59
<b>DHCA (ácido dihidrocamaléxico)</b>	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	[M + H] <sup>+</sup>	5.59	247.05	<b>247</b> , 201, 143, 118
<i>GLUCOSINOLATOS ALIFÁTICOS</i>					
<b>8MSO (8-metilsulfiniloctil glucosinolato)</b>	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>10</sub> S <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	6.57	492.10	<b>492</b> , 428, 96
<b>8MTO (8-metiltiooctil glucosinolato)</b>	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	9.45	476.11	<b>476</b> , 96
<b>4MTB (4-metiltiobutil glucosinolato)</b>	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	3.70	420.05	<b>420</b> , 259, 178, 96
<b>5MTP (5-metiltiopentil glucosinolato)</b>	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	6.66	434.06	<b>434</b> , 96
<b>7MTH (7-metiltioheptil glucosinolato)</b>	C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>9</sub> S <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	8.64	462.09	<b>462</b> , 96
<b>7MSH (7-metilsulfinilheptil glucosinolato)</b>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>10</sub> S <sub>3</sub>	[M – H] <sup>–</sup>	3.91	478.09	<b>478</b> , 96
<i>ESTÁNDAR INTERNO</i>					
<b>Biochanina A (5,7-dihidroxi-4-metoxiisoflavona)</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M – H] <sup>–</sup> / [M + H] <sup>+</sup>	12.96/12.96	283.07/285.07	<b>283</b> , 270, 242, 213/ <b>285</b> , 268, 239, 211

4.2.1 Evaluación del metabolismo secundario de los mutantes afectados en la síntesis de glucosinolatos

Uno de los objetivos propuestos en este trabajo es el de caracterizar la respuesta defensiva de *Arabidopsis* frente a estreses a nivel de la producción de metabolitos, empleando para ello líneas con alteraciones en la capacidad de producción de glucosinolatos indólicos y/o alifáticos. Para ello, se procede a analizar los resultados de los mutantes *atr1D*, *cyp79b2* *cyp79b3* y *qKO* tratados tal y como se describe en la Sección 3.2.

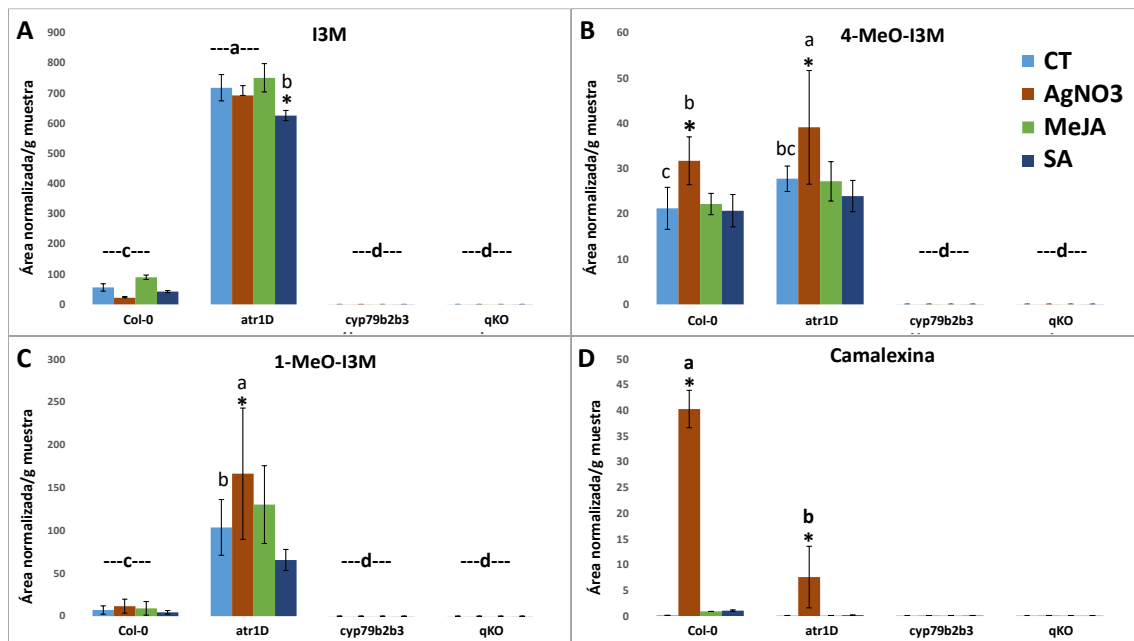


Figura 4. Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos indólicos y camalexina (A, indol-3-ilmetil glucosinolato; B, 4-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato; C, 1-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato; D, camalexina), en los genotipos Col-0, *atr1D*, *cyp79b2/b3* y *qKO* en respuesta AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamientos en  $P \leq 0,05$ .

Los niveles de glucosinolatos indólicos (Figura 4) muestran varios resultados esperados teniendo en cuenta los genotipos estudiados (Celeza *et al.*, 2005). El mutante de sobreexpresión de GNIs (*atr1D*) presenta niveles de glucosinolatos indólicos totales que son 20 veces superiores a los que encontramos en Col-0, aunque algunos de ellos como el 4-MeO-I3M apenas varían entre el mutante *atr1D* y Col-0, lo cual indicaría que sus niveles podrían no estar regulados por el gen codificado por *atr1D*, AtMYB34. Sin embargo, la camalexina y otros glucosinolatos indólicos presentan valores diferenciales bajo el tratamiento con AgNO<sub>3</sub> respecto del control tratado con agua tanto en Col-0 como

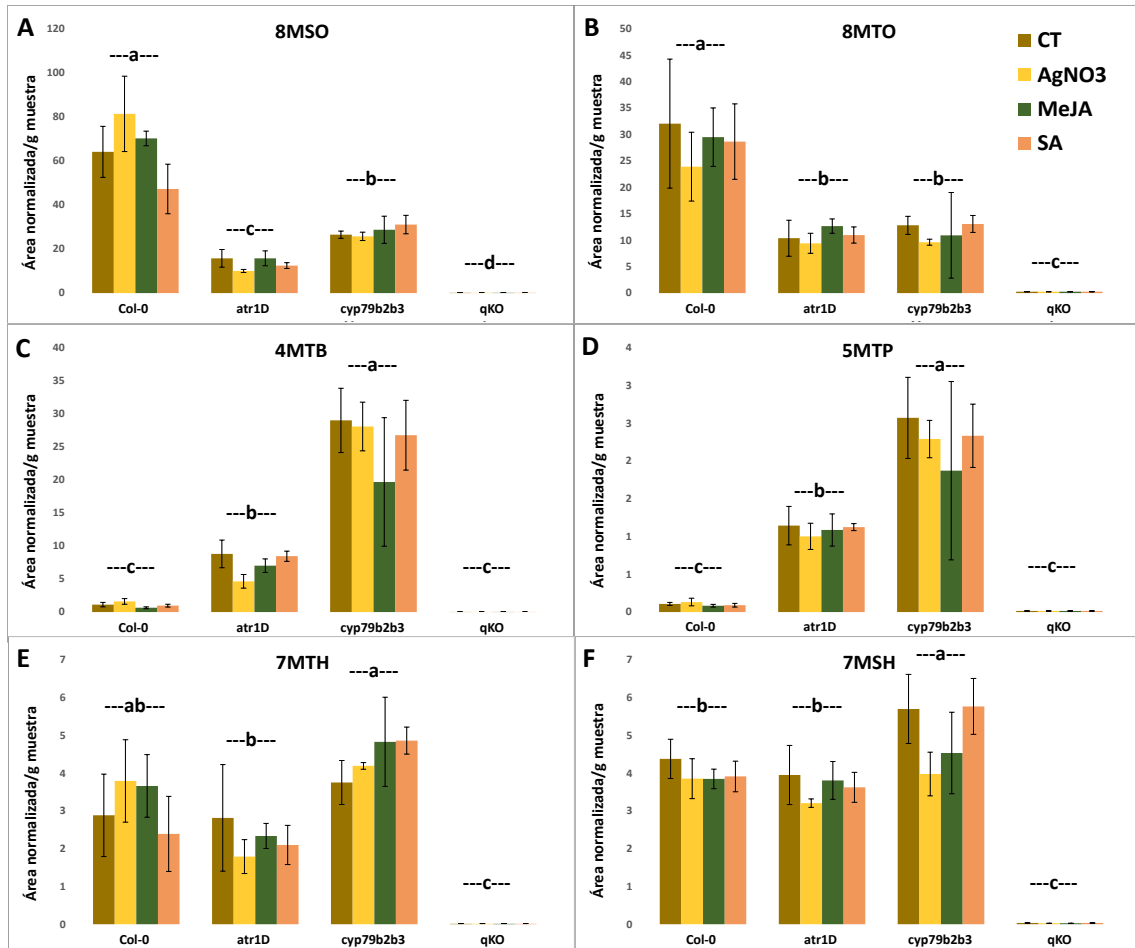
## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

en *atr1D*, viéndose las mayores diferencias para la camalexina donde sus niveles en Col-0 fueron 8 veces superiores a los del mutante *atr1D* (Figura 4, **D**), lo que apunta a una regulación diferencial de la acumulación de camalexina en Col-0 y *atr1D*, concretamente podría tratarse de una derivación del flujo de sustrato indólico hacia la producción de GNIs y no camalexina, resultado de la sobreexpresión de AtMYB34. En otras especies como *B. juncea*, el tratamiento con MeJA y SA como elicitores tuvo como resultado el incremento de los niveles de glucosinolatos indólicos sugiriendo que este grupo de compuestos podría ser una diana principal de estas rutas de señalización (Augustine y Bisht, 2015). Aunque en Zandalinas *et al.* 2012, utilizando el mismo sistema de elicitación con AgNO<sub>3</sub>, los niveles de I3M se vieron reducidos siguiendo una tendencia similar a la de este trabajo. Por otro lado, tenemos a los mutantes deficientes en glucosinolatos indólicos y/o alifáticos (*cyp79b2 cyp79b3* y *qKO*) que presentan valores prácticamente indetectables para estos compuestos debido a que su ruta de biosíntesis está truncada (Figura 3). Los datos analíticos confirman el fenotipo esperado de hiperacumulación o ausencia de metabolitos indólicos descrito en otros trabajos (Zandalinas *et al.*, 2012; Sønderby *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2002). En cuanto a los efectos de los diferentes tratamientos, el AgNO<sub>3</sub> muestra un impacto claro que va en la misma dirección sobre el metabolismo secundario de todas las líneas estudiadas, mientras que el SA parece tener un efecto diferente que podría deberse a que este elicitor estaría estimulando otros subconjuntos de genes de síntesis de GNs (Mitreiter y Gigolashvili 2020; Augustine y Bisht, 2015).

En el caso de los glucosinolatos alifáticos (Figura 5), podemos observar cómo no parece haber una acumulación significativa según tratamiento en ningún caso, al contrario que en los GNIs (Figura 4). Por ejemplo, el MeJA parece no tener ningún efecto sobre los glucosinolatos alifáticos, lo que también se da en otras especies como *B. juncea* (Augustine y Bisht, 2015) aunque se ha descrito un efecto menor sobre la acumulación de los GNAs cuando se emplea JA (Mitreiter y Gigolashvili 2020). No obstante, si comparamos la respuesta según genotipos se puede observar como para el mutante *atr1D*, que esta caracterizado por presentar elevadas concentraciones de glucosinolatos indólicos, y para el mutante *cyp79b2cyp79b* los glucosinolatos 8MSO y 8MTO presentan valores hasta 3 veces menores que en las plantas del ecotipo Col-0 ( $P \leq 0,05$ ). Sin embargo, los niveles de glucosinolatos 4MTB y 5MTP son mayores para ambos mutantes que para el Col-0 (Figura 5). Esto podría indicar un control coordinado de las diferentes rutas

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

biosintéticas de glucosinolatos, por el que la inhibición de una clase de estos metabolitos resulta en un aumento compensatorio en otra clase y *viceversa* (Martínez-Ballesta *et al.*, 2015; Malitsky *et al.*, 2008). En cuanto al cuádruple mutante, este presenta valores similares a los analizados en la Figura 4, pues su ruta de biosíntesis de GNAs también está afectada (Figura 3) (Zandalinas *et al.*, 2012; Sønderby *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2002).



**Figura 5. Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos alifáticos (A, 8-metilsulfiniocetil glucosinolato; B, 8-metiltiooctil glucosinolato; C, 4-metiltiobutil glucosinolato; D, 5-metiltiopentil glucosinolato; E, 7-metiltioheptil glucosinolato; F, 7-metilsulfiniheptil glucosinolato) en los genotipos Col-0, *atr1D*, *cyp79b2/b3* y *qKO* en respuesta AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamientos en  $P \leq 0,05$ .**

A nivel hormonal, en la Figura 6 podemos ver la cuantificación relativa de las hormonas de respuesta al estrés JA y SA, junto con algunos de sus precursores y otros compuestos relacionados. Como se puede observar, en el caso de las oxilipinas el tratamiento de AgNO<sub>3</sub> produce la respuesta más pronunciada, como por ejemplo la respuesta del genotipo silvestre Col-0 (30 u g<sup>-1</sup> en 12-OPDA 6-10 veces superiores a los de cualquier otro genotipo estudiado) (Figura 6, A, B, C y D), siendo la respuesta de los

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

mutantes significativamente menor respecto de esta ( $P \leq 0,05$ ). Igualmente, parece destacable la acumulación de estas oxilipinas en los mutantes deficientes en GNs (*cyp79b2 cyp79b3* y *qKO*), en contraste con los datos del hiperacumulador de GNIs, *atr1D*. Por otro lado, los mutantes *cyp79b2 cyp79b3* y *qKO* presentan unos niveles de SA y SAGE (Figura 6, E y F) similares y significativamente superiores respecto de sus controles ( $P \leq 0,05$ ), destacando la posible interacción entre SA y GNs indólicos. Teniendo en cuenta todos los datos analizados, los resultados indican una reducción de los niveles de precursores y derivados de JA y SA, así como las propias formas activas, en respuesta a la perturbación de las rutas de biosíntesis de los glucosinolatos, por lo tanto, como afirman Chen *et al.*, (2012) esto apuntaría a que las redes hormonales en las que están implicadas el JA y SA están conectadas al metabolismo de los glucosinolatos y su acumulación depende en gran medida de la presencia de estas hormonas.

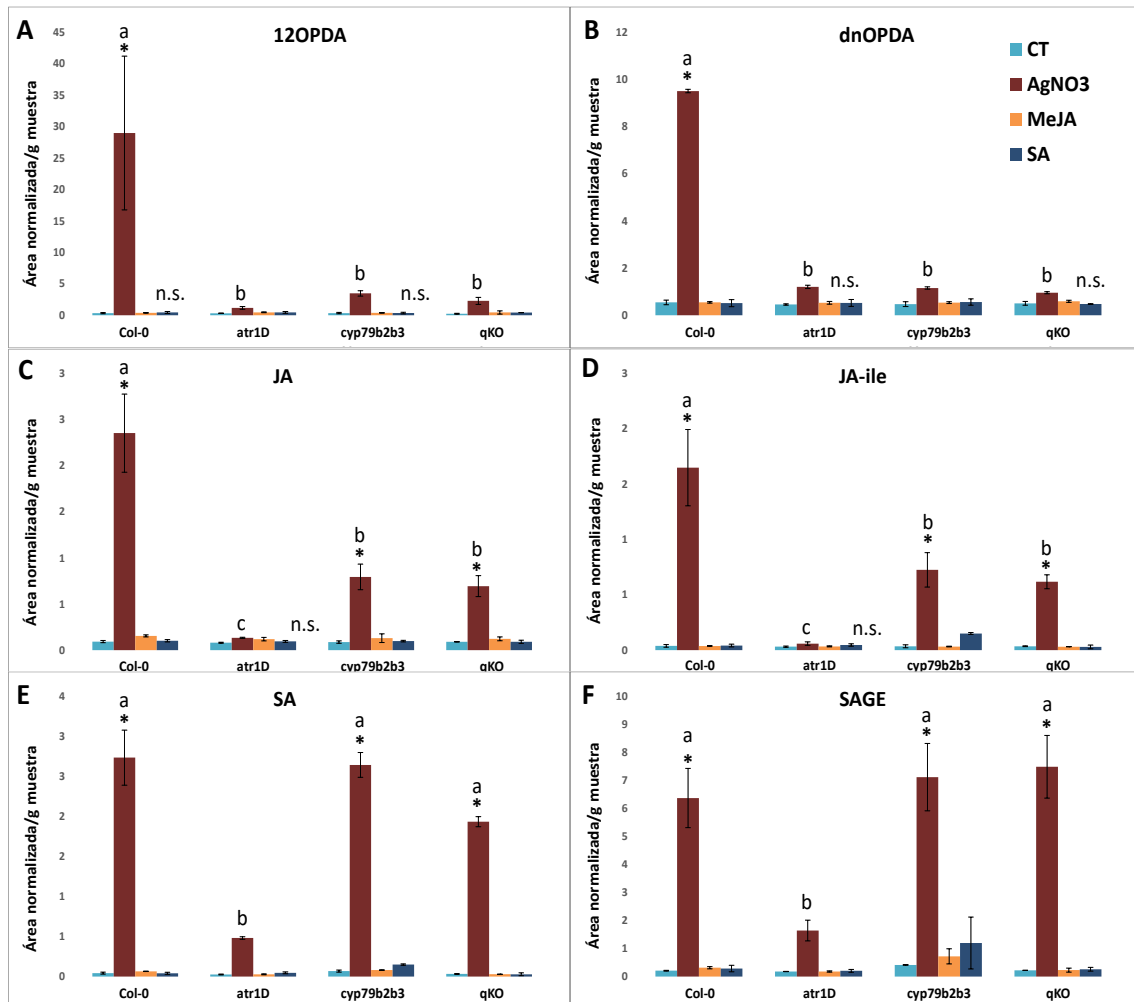


Figura 6. Cuantificación relativa de los niveles de las hormonas JA y SA, algunos de sus precursores y derivados, (A, ác. 12-Oxo fitodienoico; B, ác dinor 12-Oxo fitodienoico; C, ác. jasmónico; D, jasmonato isoleucina; E, ác. Salicílico; F, glicosil salicilato) en los genotipos Col-0, *atr1D*, *cyp79b2/b3* y *qKO* en respuesta AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamientos en  $P \leq 0,05$ ; n.s., no significativo.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

Otra de las rutas que se activa en respuesta a estrés, y permite completar la caracterización de la respuesta metabólica a los diferentes tratamientos, es la de los fenilpropanoides (Yadav *et al.*, 2020). En este trabajo se analizó la composición en algunos compuestos fenólicos que podemos encontrar identificados en la Tabla 3. Así pues, en la Figura 7 encontramos la cuantificación relativa de dos metabolitos relacionados con esta ruta (Figura 7, **A** y **B**), cuyos niveles basales y de acumulación son significativamente superiores ( $P \leq 0,05$ ) en *cyp79b2 cyp79b3* y *qKO* respecto del ecotipo y del hiperacumulador, que no presentó acumulación significativa. De igual modo, otro compuesto de esta ruta, la sinapoil glucosa (Figura 7, **C**), presentó niveles basales significativamente menores en el mutante *atr1D* respecto de los otros genotipos (hasta 10 veces por debajo del ecotipo Col-0, 20 u  $g^{-1}$  contra 10 u  $g^{-1}$  en *atr1D*). Por último, uno de los compuestos finales de la ruta, el sinapoil malato, presentó valores significativamente mayores de acumulación en los mutantes *atr1D* y *qKO*, donde los tratamientos no parecen ejercer ningún efecto diferencial. Si tenemos en cuenta que, según Zhang *et al.*, (2020), los mutantes de *Arabidopsis* con defectos en la biosíntesis de GNs también muestran defectos en la producción de fenilpropanoides, debido a la acumulación de aldoximas o sus derivados, podemos dar sentido a nuestros resultados, ya que el mutante que muestra datos de hiperacumulación en la ruta biosíntesis de GNIs muestra los valores menos destacables de acumulación de estos compuestos (Zhang *et al.*, 2020; Hemm *et al.*, 2002).

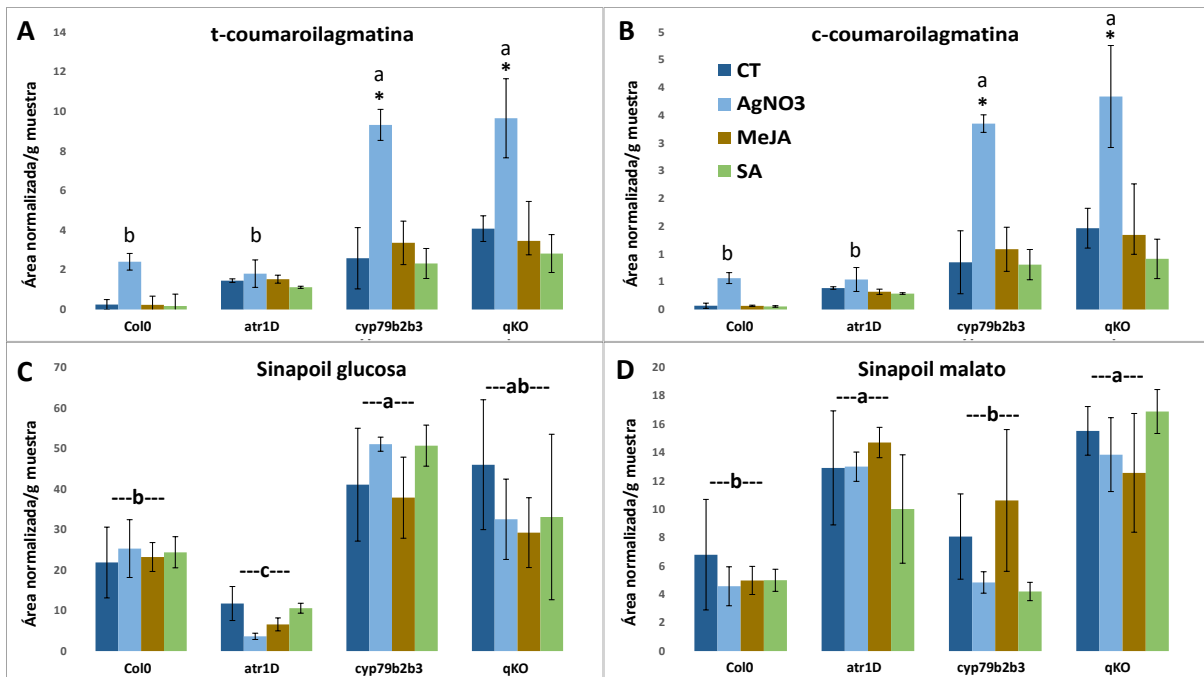


Figura 7. Cuantificación relativa de los niveles de compuestos fenólicos (A, t-coumaroilagmatina; B, c-coumaroilagmatina; C, sinapoil glucosa; D, sinapoil malato) en los genotipos Col-0, *atr1D*, *cyp79b2/b3* y *qKO* en respuesta AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos sometidos al mismo tratamiento en  $P \leq 0,05$ .

4.2.2 Evaluación del metabolismo secundario de los mutantes relacionados con SA y JA

Otro de los objetivos propuestos es el de comprobar la relación entre tratamientos, regulación hormonal y producción de metabolitos secundarios en mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la señalización o producción de SA o JAs. Para ello, se procede a analizar los resultados de los mutantes de señalización hormonal *jai1-1/jin1-2* y *npr1*, además de los mutantes de biosíntesis *ics2* y *jar1*, tratados tal y como se describe en la Sección 3.2.

4.2.2.1 Respuesta de los mutantes de señalización de SA y jasmonatos

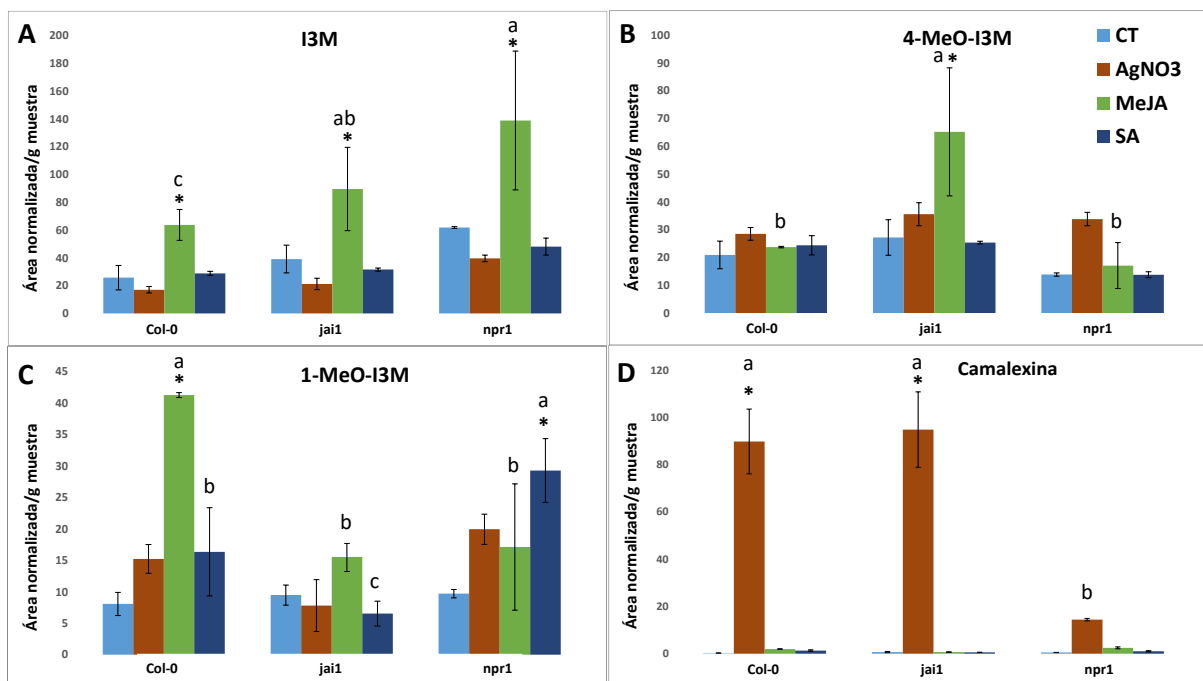


Figura 8. Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos indólicos y Camalexina (A, indol-3-ilmetil glucosinolato; B, 4-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato; C, 1-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato; D, camalexina) en los genotipos Col-0, *jai1* y *npr1* en respuesta AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamientos  $P \leq 0,05$ .

En cuanto a los glucosinolatos indólicos (Figura 8), podemos ver una respuesta diferente para cada compuesto según el tratamiento y el mutante observado. En el caso de I3M (Figura 8, A), el tratamiento con MeJA provoca un aumento significativamente mayor con respecto al control para todos los genotipos analizados ( $P \leq 0,05$ ) alcanzando valores que doblan el resto de los tratamientos ( $60 \text{ u g}^{-1}$  en Col-0,  $80 \text{ u g}^{-1}$  en *jai1*,  $140 \text{ u g}^{-1}$  en *npr1*). Llama la atención que este resultado difiere de los valores obtenidos con los anteriores genotipos (Figura 4) por lo que el experimento va a ser repetido. Por otro lado, para 4-MeO-I3M (Figura 8, B), el tratamiento con MeJA solo tiene un efecto significativo en el mutante *jai1-1/jin1-2* con una

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

media de 60 u g<sup>-1</sup>, mientras que en el mutante *npr1* es el AgNO<sub>3</sub> el que produce una mayor acumulación con una media de 30 u g<sup>-1</sup>. Finalmente, para el compuesto 1-MeO-I3M (Figura 8, C), el tratamiento con MeJA también deja valores significativamente mayores para el ecotipo Col-0, alcanzando las 40 u g<sup>-1</sup> mientras que en el mutante *npr1* son significativos los valores por el tratamiento con SA, con 25 u g<sup>-1</sup>. Por otro lado, los valores de camalexina (Figura 8, D), son significativamente mayores únicamente en el caso de las plantas tratadas con AgNO<sub>3</sub>, con un incremento muy similar en el mutante de señalización de JA, *jai1-1/jin1-2*, y en Col-0, mientras que el mutante *npr1* muestra valores significativamente menores ( $P \leq 0.05$ ), casi 5 veces, que el resto de los genotipos. Estos valores apuntan a lo que se ha mencionado anteriormente, el JA tiende a ser un elicitor que tiene un mayor efecto sobre los GNIs (Mitreiter y Gigolashvili 2020; Augustine y Bisht, 2015). Sin embargo, los mutantes de las rutas de señalización de SA y JA se ven afectados en la biosíntesis de GNs, en comparación con Col-0, de forma similar a otros mutantes de la ruta de señalización de JA (*myc2/3/4*, en Chhajed *et al.*, 2020), corroborando la idea que el metabolismo de las hormonas JA y SA está conectado con el de los GNs, siendo claves para esta conexión los elementos de las rutas de señalización MYC2 y NPR1 (Chen *et al.*, 2012; Mikkelsen *et al.*, 2003).

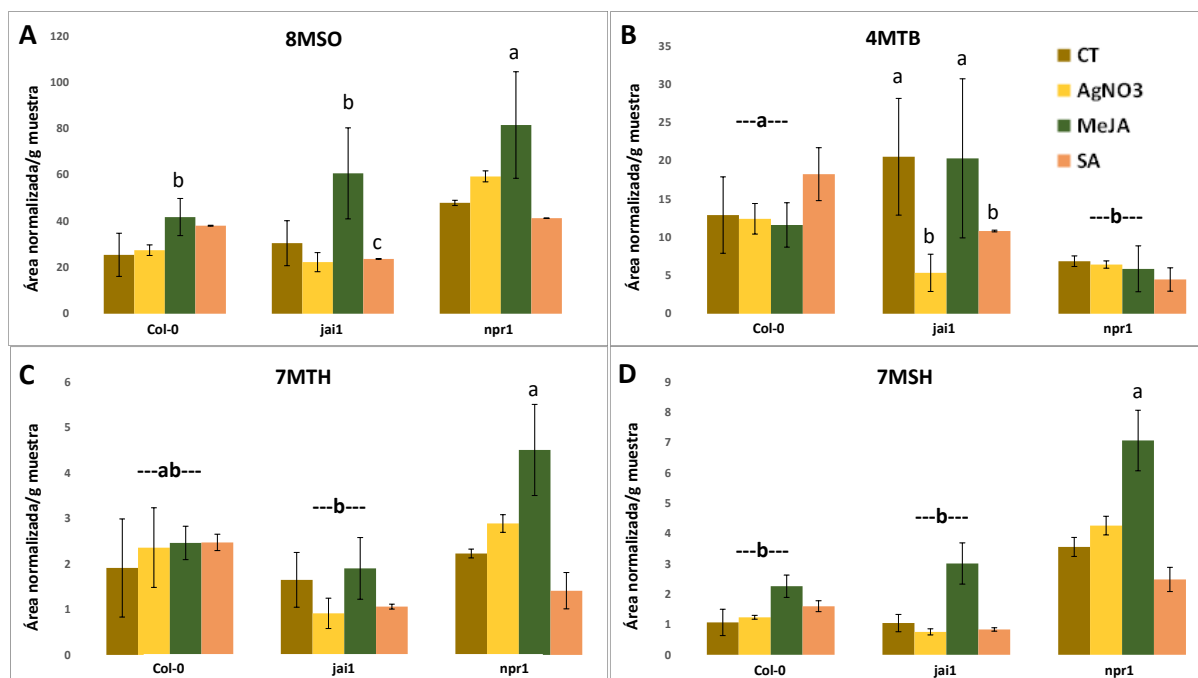


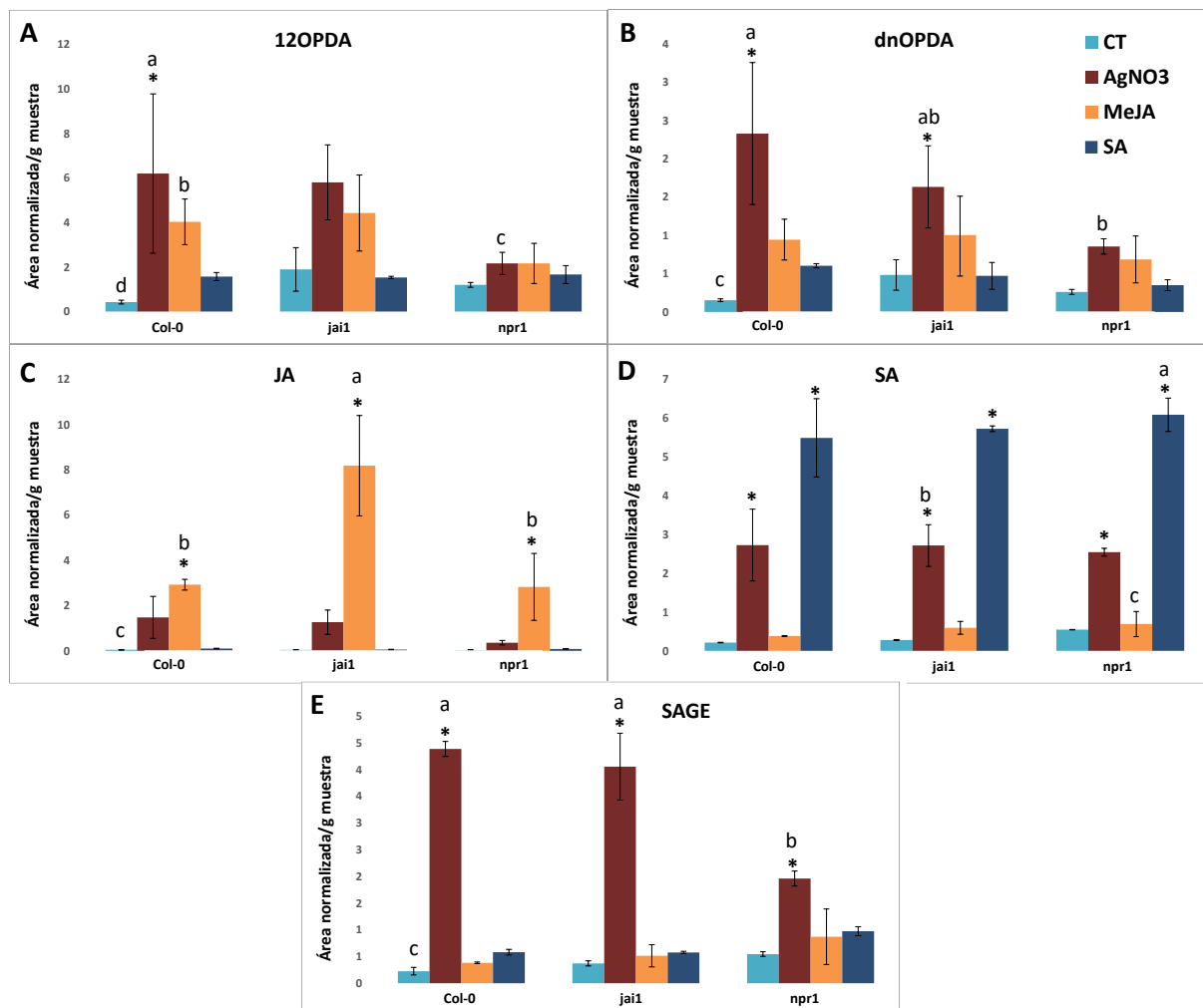
Figura 9. Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos alifáticos (A, 8-metilsulfiniolcil glucosinolato; B, 4-metiltiobutil glucosinolato; C, 7-metiltioheptil glucosinolato; D, 7-metilsulfiniheptil glucosinolato), en los genotipos Col0, *jai1* y *npr1* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamientos en  $P \leq 0,05$ .

Para analizar los niveles de glucosinolatos alifáticos, nos fijamos en la cuantificación relativa de los compuestos reflejados en la Figura 9 De forma general podemos ver como es el



## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

genotipo el que determina los incrementos relativos en los niveles de la mayoría de los metabolitos. No obstante, en el caso del metabolito 8MSO (Figura 9, **A**), el tratamiento con MeJA afecta de forma más significativa, como ocurre con los GNIs (Figura 8), sobre todo en el mutante *npr1* ya que casi duplica los valores de Col-0. Este patrón se repite en el caso de los compuestos 7MTH y 7MSH (Figura 9, **C** y **D**), que presentan una respuesta muy similar, aunque con valores totales menores y no significativos. Por último, en el metabolito 4MTB (Figura 9, **B**), muestra valores menores en el mutante de señalización de SA, *npr1*, y su acumulación parece mayor en el mutante *jai1-1/jin1-2* y en Col-0. Estos datos están en sintonía con los publicados en Mikkelsen *et al.*, (2003). La concentración de glucosinolatos alifáticos, como el 8MSO, aumentó después del tratamiento con MeJA sobre mutantes de señalización o biosíntesis de JA y SA. Además, parece que la acumulación de estos viene determinada por MYC2, actuando como regulador positivo de la ruta de biosíntesis de GNAs (Mitreiter y Gigolashvili 2020).



**Figura 10. Cuantificación relativa de los niveles de las hormonas JA y SA, algunos de sus precursores y derivados, (A, ác. 12-0xo fitodienoico; B, ác. dinor 12-0xo fitodienoico; C, ác. jasmónico; D, ác. Salicílico; E, glicosil salicilato) en los genotipos Col-0, *jai1* y *npr1* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamientos en  $P \leq 0,05$ .**

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

A nivel hormonal, si nos fijamos en la Figura 10, podemos ver como el tratamiento con  $\text{AgNO}_3$  afecta a Col-0 y al mutante *jai1-1/jin1-2*, dando lugar a incrementos significativos en todos los metabolitos analizados, hecho que no se observa en el mutante *npr1* (Figura 10). Esto podría deberse que, a nivel de señalización, la mutación en NPR1 está teniendo algún efecto más allá de la ruta de señalización de SA, afectando a otras redes hormonales, como la del JA (Berens *et al.*, 2017; Pieterse *et al.*, 2012). Por otro lado, los tratamientos MeJA y SA son capaces de provocar aumentos significativos, en la cuantificación relativa de JA y del SA respectivamente (Figura 10, C y D), en todas las líneas con respecto a sus propios controles (CT) ( $P \leq 0,05$ ). Según Dempsey *et al.*, (2011), el tratamiento exógeno con SA induce la expresión de varios de los genes que participan en la ruta de biosíntesis de esta misma hormona, lo que explica los valores obtenidos. De igual modo, en otras especies como el kiwi, el elicitor MeJA es capaz de incrementar la expresión del JA endógeno (Wei *et al.*, 2021). En ambos casos tampoco podemos descartar que se estén detectando la hormona exógena porque el tratamiento dura solamente 24 horas.

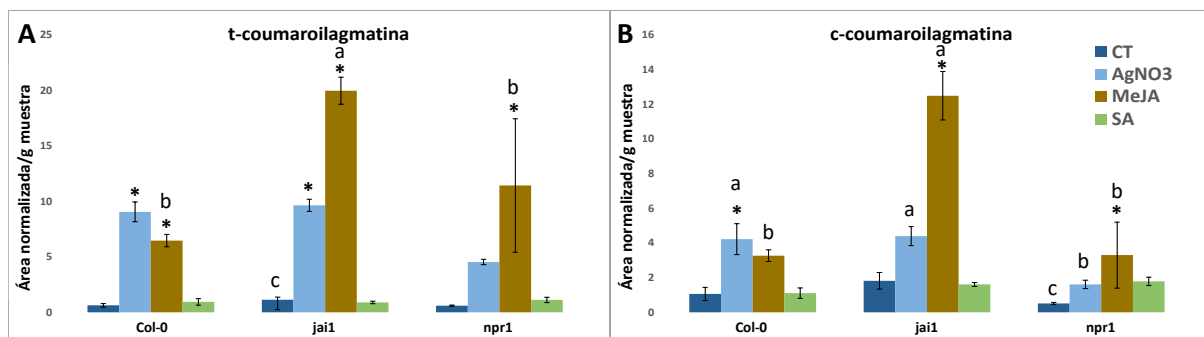


Figura 11. Cuantificación relativa de los niveles de compuestos fenólicos (A, t-coumaroilagmatina; B, c-coumaroilagmatina) en los genotipos Col-0, *jai1* y *npr1* en respuesta  $\text{AgNO}_3$ , MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamientos en  $P \leq 0,05$ .

Para finalizar, como hemos mencionado anteriormente, es importante destacar la respuesta de otros compuestos fenólicos (Tabla 3). En este caso (Figura 11), los valores en ambos isómeros son significativamente mayores en todas las líneas sometidas a los tratamientos con  $\text{AgNO}_3$  y MeJA ( $P \leq 0,05$ ). En caso del tratamiento con  $\text{AgNO}_3$ , los valores son similares entre el mutante *jai1* y el ecotipo Col-0 (10  $\text{u g}^{-1}$  A, 4  $\text{u g}^{-1}$  B), mientras que bajo el tratamiento con MeJA son los datos de *npr1* los más similares a los del ecotipo Col-0 (5  $\text{u g}^{-1}$  A, 3  $\text{u g}^{-1}$  B) y destacan significativamente los niveles de *jai1-1/jin1-2*, entre 20 y 10 veces por encima de los valores observados en CT. Por otro lado, el SA no parece tener efectos sobre la acumulación de estos compuestos en ninguna de las líneas estudiadas. Por lo tanto, nuestros datos coinciden con lo mostrado por Wei *et al.*, (2021), donde el MeJA aumentó la actividad

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

enzimática del metabolismo de los fenilpropanoides e indujo la acumulación de fenoles y flavonoides en kiwi. El mayor efecto observado sobre el mutante *jai1* sugiere que el efecto de  $\text{AgNO}_3$  y MeJA no depende directamente de MYC2, pero éste sí podría actuar modulando la acumulación de estos compuestos (Yadav *et al.*, 2020).

### 4.2.2.2 Respuesta de los mutantes de biosíntesis de SA y jasmonatos

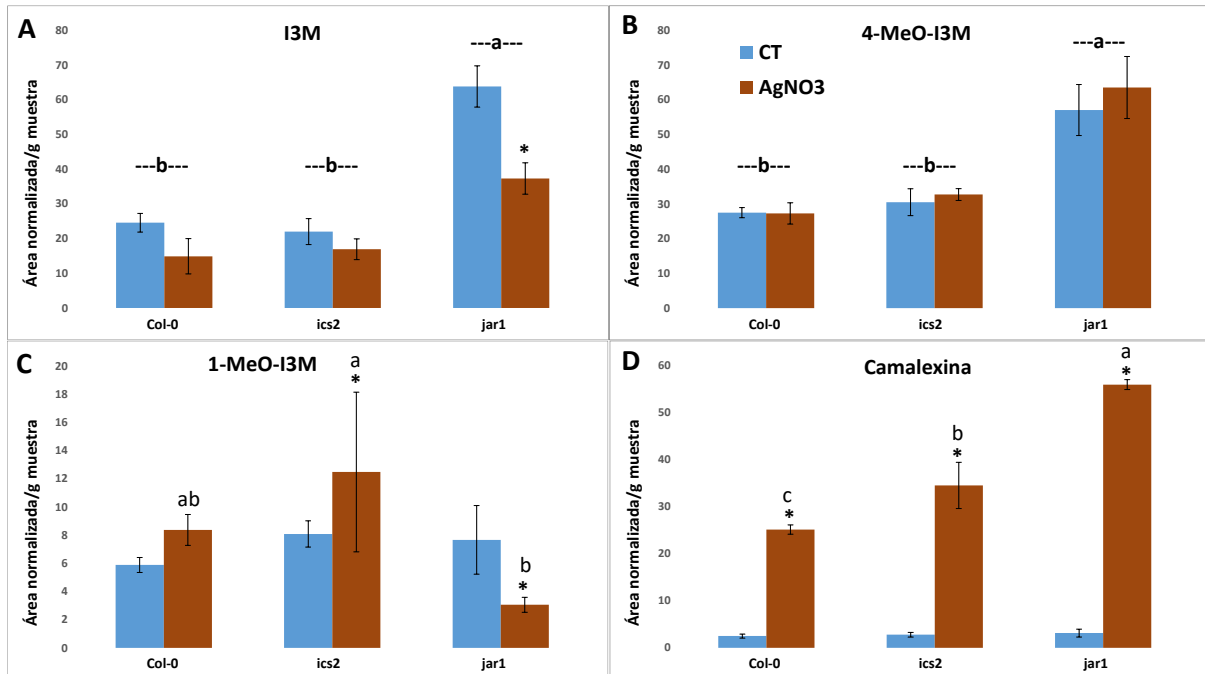


Figura 12. Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos indólicos y Camalexina (A, indol-3-ilmetil glucosinolato; B, 4-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato; C, 1-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato; D, Camalexina) en los genotipos Col-0, *ics2* y *jar1* en respuesta a  $\text{AgNO}_3$ , MeJA y SA. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamiento en  $P \leq 0,05$ .

En cuanto a los glucosinolatos indólicos (Figura 12), se pueden observar ciertas diferencias atribuibles al tratamiento con  $\text{AgNO}_3$  y a los diferentes genotipos analizados. En el caso de los compuestos I3M y 4-MeO-I3M para el mutante *jar1* los valores basales son significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ), (Figura 12, A y B), y cuando se trata con  $\text{AgNO}_3$  los niveles de los compuestos I3M y 1-MeO-I3M se reducen significativamente, al contrario de lo que ocurre con la camalexina donde sus niveles se inducen en todos los genotipos y especialmente en el mutante *jar1* ( $25 \text{ u g}^{-1}$  en Col-0 contra  $55 \text{ u g}^{-1}$  *jar1*) (Figura 12). En cuanto al mutante *jar1*, la modificación de los niveles de los GNIs y de la camalexina indicaría un

efecto modulador de los JAs sobre los niveles de acumulación de estos metabolitos (Mitreiter y Gigolashvili 2020)

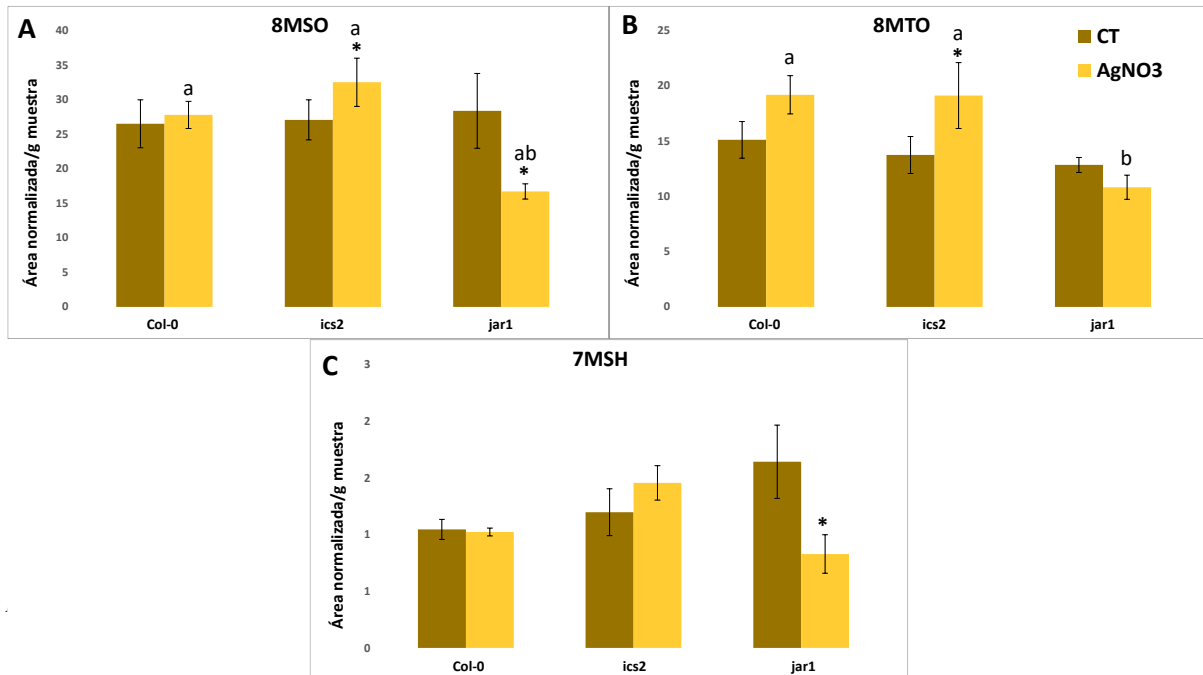
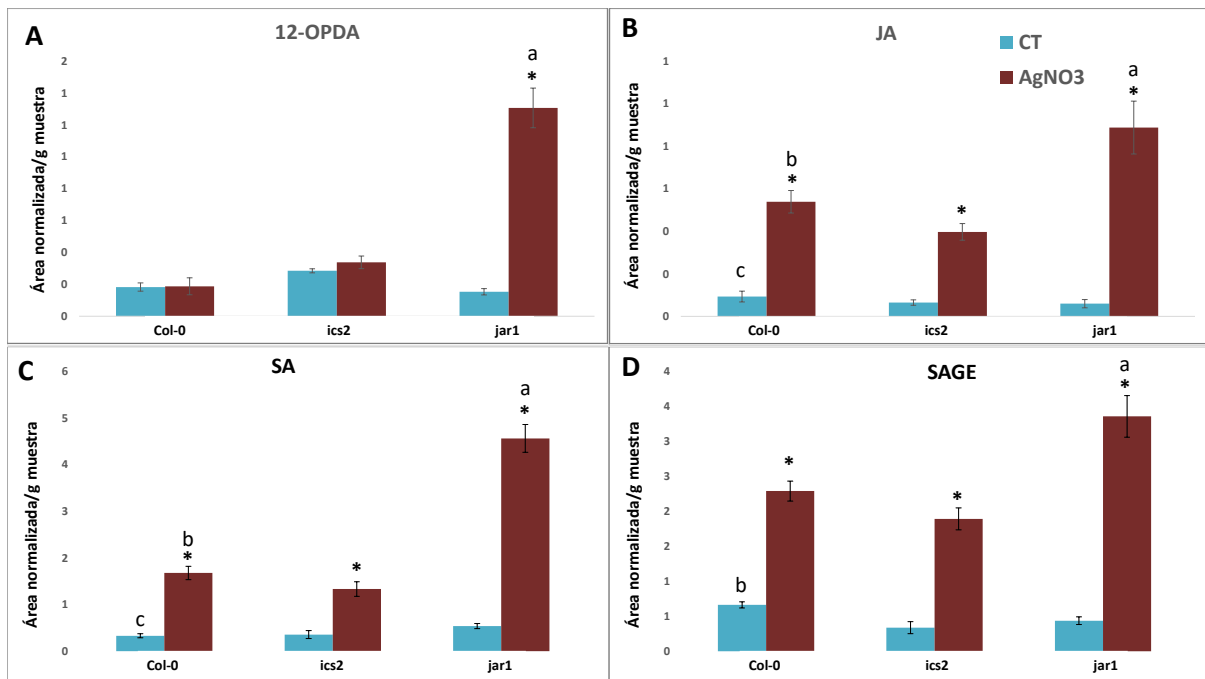


Figura 13. Cuantificación relativa de los niveles de glucosinolatos alifáticos (A, 8-metilsulfiniolcil glucosinolato; B, 8-metiltiooctil glucosinolato; C, 7-metilsulfiniheptil glucosinolato) en los genotipos Col0, *ics2* y *jar1* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamiento en  $P \leq 0,05$ .

Si nos fijamos en los glucosinolatos alifáticos (Figura 13), únicamente es destacable una acumulación marginal de 8MTO y 8MSO (Figura 13, A y B) en Col-0 como respuesta a AgNO<sub>3</sub> y, de igual manera, en *ics2* y el descenso en *jar1* de 7MSH y 8MSO (30 u g<sup>-1</sup> Col-0 contra 15 u g<sup>-1</sup> *jar1*) ( $P \leq 0,05$ , Figura 13, A y C). En este caso la presencia del elicitor AgNO<sub>3</sub> inicia las rutas de señalización defensivas, como hemos mencionado anteriormente, y para el mutante *ics2* la ruta del JA se mantendría activa y estaría estimulando la biosíntesis y la acumulación de GNAs (Mitreiter y Gigolashvili, 2020).

A nivel hormonal (Figura 14), los compuestos presentan un aumento significativo provocado por el tratamiento en el mutante *jar1*, hasta 4 veces por encima comparado con sus controles no tratados (CT). Para el mutante *ics2*, por ejemplo, los niveles totales de SAGE son comparables a los del ecotipo Col-0 antes (1 u g<sup>-1</sup>) y después (2 u g<sup>-1</sup>) del tratamiento inductor con AgNO<sub>3</sub>, así como los de SA también son comparables a los del ecotipo Col-0 antes (0,5 u g<sup>-1</sup>) y después (2,5 u g<sup>-1</sup>) del tratamiento con AgNO<sub>3</sub> tal y como se menciona en Dempsey *et al.*, (2011). En el caso de las oxipilinas, los datos de dnOPDA no han resultado significativos en presencia de AgNO<sub>3</sub>, por lo que no se muestran en esta figura.

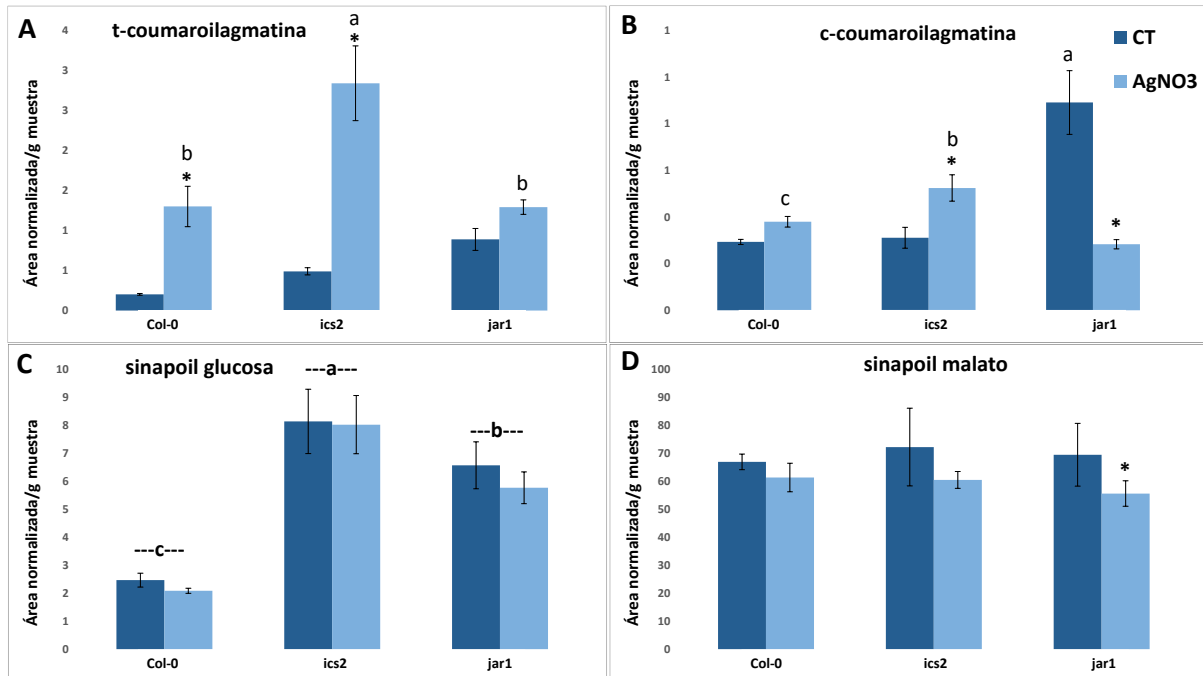
## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*



**Figura 14. Cuantificación relativa de los niveles de las hormonas, SA y derivados, (A, ác. 12-Oxo fitodienoico; B, ác. jasmónico; C, ác. Salicílico; D, glicosil salicilato) en los genotipos Col-0, *ics2* y *jar1* en respuesta AgNO<sub>3</sub>. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamiento en  $P \leq 0,05$ .**

Por último, analizamos la respuesta de algunos compuestos fenólicos (Tabla 3), cuya acumulación observamos en la Figura 15. La t-coumaroilagmatina presenta niveles significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ) en presencia de AgNO<sub>3</sub> en el mutante *ics2* y en Col-0 pero no en el mutantes *jar1*, lo cual indica que el incremento de sus niveles en plantas tratadas depende de JA, (Figura 15, A). En cambio, en el metabolito c-coumaroilagmatina (Figura 15, B) se observa una reducción de sus niveles respecto del control en el mutante *jar1*, pero un incremento en el mutante *ics2*, lo que sugeriría papel positivo para el JA y negativo para el SA en la producción de este metabolito. Según Ghamari *et al.*, (2019), hormonas como el SA conducen al incremento de la actividad en esta ruta, por ello cuando el elicitor AgNO<sub>3</sub> activa estas vías hormonales se inician varios procesos defensivos, entre ellos la actividad PAL. Además, lo que observemos en este genotipo bajo el tratamiento con AgNO<sub>3</sub> es paralelo a lo que se ve en *npr1* (Figura 11), de modo que guarda relación con el papel del SA en la elicitación de estas respuestas metabólicas.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*



**Figura 15. Cuantificación relativa de los niveles de compuestos fenólicos (A, t-coumaroilagmatina; B, c-coumaroilagmatina; C, sinapoiil glucosa; D, sinapoiil malato) en los genotipos Col-0, ics2 y jar1 en respuesta a AgNO<sub>3</sub>. Los asteriscos (\*) denotan significación estadística en  $P \leq 0,05$  con relación a los controles (CT). Las letras distintas denotan diferencias estadísticas entre genotipos y tratamiento en  $P \leq 0,05$ .**

### 4.3 Efectos de los elicitores sobre los genes de interés

Analizamos los niveles de ARNm de los genes que se detallan en la figura 16, relacionados con los metabolitos de interés para este estudio. En primer lugar, PR-1 es un gen PR (Relacionados con Patogénesis) que se usa habitualmente como marcador para la expresión génica en respuesta a SA (Pieterse *et al.*, 2012). A continuación, ORA59 que pertenece a la familia de los ERF, que se ha involucrado en la respuesta frente a patógenos regulada por las hormonas etileno y JA, y el gen PDF1.2, siendo ambos marcadores de la respuesta mediada por el JA (Pieterse *et al.*, 2012). Posteriormente, se incluyen dos genes que codifican para enzimas del citocromo P450 catalizadoras de la biosíntesis de la estructura central de los GNs indólicos, CYP70B2, y alifáticos, CYP83A1 (Harun *et al.*, 2020). Para finalizar, se analizan los niveles de expresión relativos de algunos de los factores de transcripción tipo MYB, principales reguladores de la ruta de biosíntesis de glucosinolatos tanto alifáticos, MYB29, como indólicos, MYB51 y MYB34/ATR1 (Harun *et al.*, 2020).

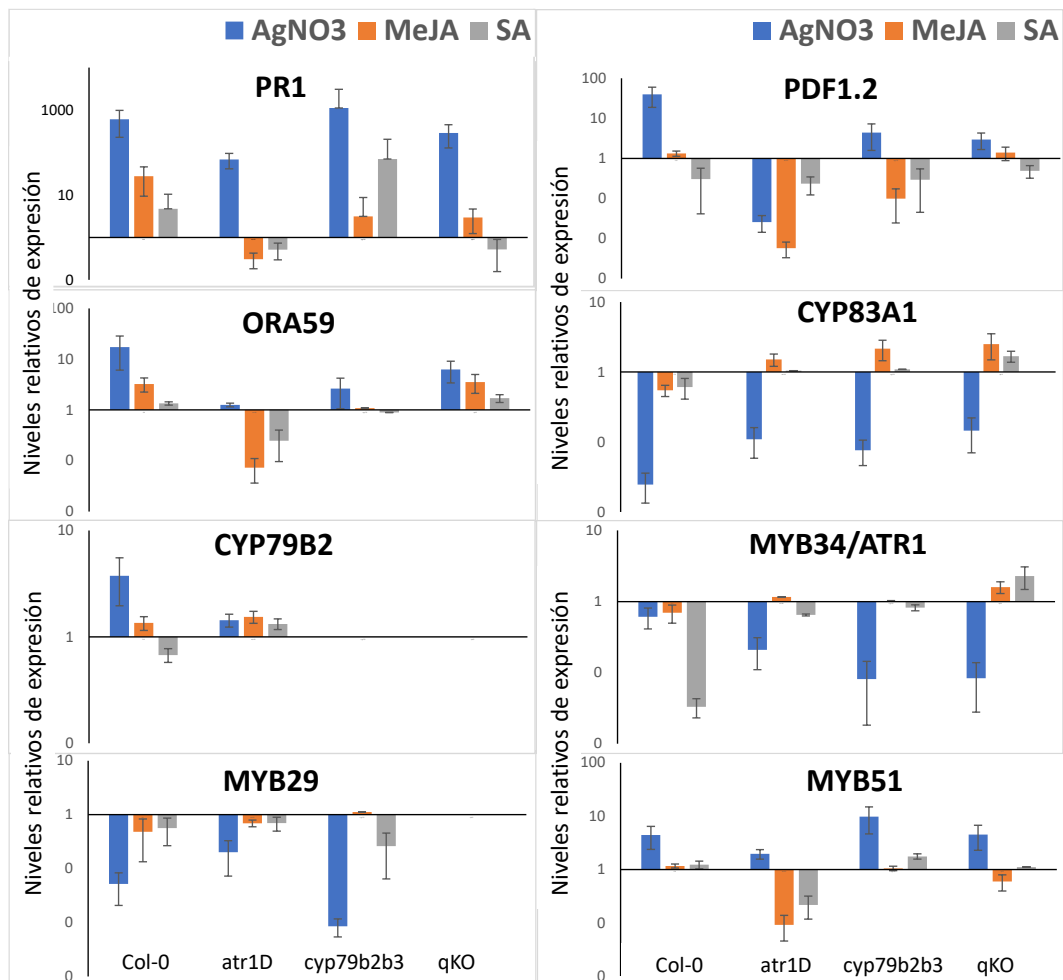


Figura 16. Niveles de expresión relativos de genes relacionados con diversas rutas de señalización en *Arabidopsis*, en los genotipos Col-0, *atr1D*, *cyp79b2/b3* y *qKO* en respuesta a AgNO<sub>3</sub>, MeJA y SA.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

Los niveles de expresión de PR1 fueron claramente inducidos por el tratamiento con AgNO<sub>3</sub> en todos los genotipos mientras que el efecto del MeJA y SA se vio claramente modificado en el mutante de sobreexpresión de GNIs, *atr1D* donde se observó una reducción de la expresión de PR1, ORA59 y de PDF1.2, lo cual sugiere una reducción de la señalización de JAs y SA. Esta reducción podría deberse a la elevada presencia de estos GNIs en el mutante (Figura 4 y 5), indicando una comunicación entre la ruta de biosíntesis de GNIs y las rutas de señalización de JAs y SA. En los mutantes los mutantes *cyp79b2 cyp79b3* y *qKO*, los resultados no fueron tan claros, aunque sí se observó cierta modulación de la respuesta a los elicitores, lo cual indicaría un posible efecto compensatorio entre las rutas de señalización de SA y JAs para regular la biosíntesis de los glucosinolatos donde, se equilibraría la ausencia de GNIs con la presencia de GNAs (Figura 5) (Martínez-Ballesta *et al.*, 2015)

En cuanto al resto de genes, en general, el patrón de expresión parece estar en consonancia con los perfiles alterados de glucosinolatos observados. Por ejemplo, la expresión del gen CYP79B2 no cambió en respuesta a los tres elicitores en el mutante *atr1D*, pero el gen CYP83A1 si modificó su patrón de expresión, aunque solo en presencia de las hormonas JAs y SA, lo que concuerda con los resultados de la Figura 5. El factor de transcripción que regula la biosíntesis de GNAs, MYB29, presentó unos resultados muy similares en todos los fondos mutantes estudiados (Figura 16) pero, por el contrario, MYB51 y MYB34/ATR1, factores de transcripción implicados en la regulación de la biosíntesis de GNIs, presentaron una mayor expresión en *cyp79b2 cyp79b3* y *qKO* bajo el tratamiento con JA y SA coincidiendo con lo publicado por Mitreiter, y Gigolashvili, (2020) y Augustine y Bisht, (2015), confirmando que los mayores niveles de GNAs observados en estos mutantes se producen por una regulación cruzada entre ambos tipos de glucosinolatos.



## 5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos estudiado la respuesta del metabolismo secundario de *Arabidopsis thaliana* a tres tratamientos elicitors de las respuestas defensivas de las plantas como es la hormona SA, el MeJA y el AgNO<sub>3</sub>, focalizándonos en la posible interacción de un tipo de estos metabolitos secundarios, los glucosinolatos, con las rutas biosintéticas y de señalización hormonal del JA y SA, obteniendo las siguientes conclusiones:

- Se observa un control coordinado de ambas rutas biosintéticas de los glucosinolatos, indólicos y alifáticos, de forma que la inhibición de una clase de estos metabolitos resulta en un aumento compensatorio en la otra clase y *viceversa*.
- En el mutante *atr1D*, hiperacumulador de GNIs, se obtiene de forma general una menor acumulación en todos los metabolitos estudiados, indicando una atenuación de la regulación mediada por JAs y SA. Los datos de regulación génica corroboran esta hipótesis.
- La señalización por JAS parece ser una pieza importante en la regulación de varios metabolitos como de algunos glucosinolatos y fenilpropanoides, tal como indican el análisis de los mutantes *jar1* y *jai1-1/jin1-2*.
- La señalización por SA tendría influencia positiva en las rutas de biosíntesis de camalexina.
- La eficiente producción de glucosinolatos indólicos en respuesta a los tratamientos elicitors, en cambio, parece requerir la activación de las rutas de JA y SA.

En conjunto, los datos apoyan la noción de que la señalización mediada por JA y SA regula, al menos en parte, la biosíntesis de glucosinolatos y otros compuestos indólicos. Al mismo tiempo que, la ausencia de éstos o su sobreproducción, tiene un efecto compensatorio sobre la producción de JAs y SA y, posiblemente, sobre sus rutas de señalización.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Augustine, R., y Bisht, N. (2015). Biotic elicitors and mechanical damage modulate glucosinolate accumulation by co-ordinated interplay of glucosinolate biosynthesis regulators in polyploid *Brassica juncea*. *Phytochemistry*, 117, 43-50.
- Antignani, V., Klocko, A., Bak, G., Chandrasekaran, S., Dunivin, T., y Nielsen, E. (2015). Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4K $\beta$ 1/ $\beta$ 2 Phosphatidylinositol-4 Kinases by the Small GTPase RabA4B Plays Important Roles during Salicylic Acid-Mediated Plant Defense Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(1), 243-261.
- Arbona, V., Argamasilla, R., y Gómez-Cadenas, A. (2010). Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila* to water and salt stress. *Journal Of Plant Physiology*, 167(16), 1342-1350.
- Arbona, V., Iglesias, D., Talón, M., y Gómez-Cadenas, A. (2009). Plant Phenotype Demarcation Using Nontargeted LC-MS and GC-MS Metabolite Profiling. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 57(16), 7338-7347.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C., y Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a Tool to Investigate Abiotic Stress Tolerance in Plants. *International Journal Of Molecular Sciences*, 14(3), 4885-4911.
- Badenes-Pérez, F., y Cartea, M. (2021). Glucosinolate Induction and Resistance to the Cabbage Moth, *Mamestra brassicae*, Differs among Kale Genotypes with High and Low Content of Sinigrin and Glucobrassicin. *Plants*, 10(9), 1951.
- Bender, J. y Fink, G. R (1998). A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10) 5655-5660.
- Berens, M., Berry, H., Mine, A., Argueso, C., y Tsuda, K. (2017). Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 401-425.
- Cao, H., Bowling, S., Gordon, A., y Dong, X. (1994). Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell*, 6, 1583-1592.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

- Cao, H., Glazebrook, J., Clark, J. D., Volko, S., y Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88, 57–63.
- Castro-Moretti, F., Gentzel, I., Mackey, D., y Alonso, A. (2020). Metabolomics as an Emerging Tool for the Study of Plant–Pathogen Interactions. *Metabolites*, 10(2), 52.
- Celenza, J. L., Quiel, J. A., Smolen, G. A., Merrikh, H., Silvestro, A. R., Normanly, J., y Bender, J. (2005). The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol*, 137(1), 253-62.
- Chen, Y., Pang, Q., He, Y., Zhu, N., Branstrom, I., Yan, X., y Chen, S. (2012). Proteomics and Metabolomics of Arabidopsis Responses to Perturbation of Glucosinolate Biosynthesis. *Molecular Plant*, 5(5), 1138-1150.
- Chhajed, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., y Chen, S. (2020). Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense. *Agronomy*, 10(11), 1786.
- Dempsey, D., Vlot, A., Wildermuth, M., y Klessig, D. (2011). Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *The Arabidopsis Book*, 9, e0156.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M. S. S. y Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3, 371-390.
- Erb, M., y Kliebenstein, D. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1), 39-52.
- Erb, M., y Reymond, P. (2019). Molecular Interactions Between Plants and Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 527-557.
- Foyer C. H. y Noctor G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environment*, 28, 1056–1071.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., y Métraux, J. P. (2008). Characterization and Biological Function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 Gene of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147(3), 1279–1287.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

- Ghamari, M., Hosseininaveh, V., Talebi, K., Nozari, J., y Allahyari, H. (2019). Biochemical Characterization of the Induced Immune System of Pistachio (*Pistacia vera*) by Salicylic Acid. *International Journal of Fruit Science*, 20(2), 117-132.
- Gill, S., y Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Glauser, G., Schweizer, F., Turlings, T., y Reymond, P. (2012). Rapid Profiling of Intact Glucosinolates in Arabidopsis Leaves by UHPLC-QTOFMS Using a Charged Surface Hybrid Column. *Phytochemical Analysis*, 23(5), 520-528.
- Harun, S., Abdullah-Zawawi, M., Goh, H., y Mohamed-Hussein, Z. (2020). A Comprehensive Gene Inventory for Glucosinolate Biosynthetic Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 68(28), 7281-7297.
- Hemm, M., Ruegger, M., y Chapple, C. (2002). The Arabidopsis ref2 Mutant Is Defective in the Gene Encoding CYP83A1 and Shows Both Phenylpropanoid and Glucosinolate Phenotypes. *The Plant Cell*, 15(1), 179-194.
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., y He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Molecular plant*, 7(8), 1267–1287.
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52(1).
- Khare, S., Singh, N., Singh, A., Hussain, I., Niharika, K., Yadav, V. et al. (2020). Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints. *Journal Of Plant Biology*, 63(3), 203-216.
- Kim, J., Zhang, X., Pascuzzi, P., Liu, C., y Chapple, C. (2019). Glucosinolate and phenylpropanoid biosynthesis are linked by proteasome-dependent degradation of PAL. *New Phytologist*, 225(1), 154-168.
- Kim, Y., Li, X., Kim, S., Kim, H., Lee, J., Kim, H., y Park, S. (2013). MYB Transcription Factors Regulate Glucosinolate Biosynthesis in Different Organs of Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Molecules*, 18(7), 8682-8695.
- Kliebenstein, D., Rowe, H., & Denby, K. (2005). Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal*, 44(1), 25-36.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

- Kuhl C, Tautenhahn R, Böttcher C, Larson TR, y Neumann S (2012) CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Anal Chem* 84, 283–289
- Lee, Y., Perdian, D., Song, Z., Yeung, E., y Nikolau, B. (2012). Use of mass spectrometry for imaging metabolites in plants. *The Plant Journal*, 70(1), 81-95.
- Lefevre, H., Bauters, L., y Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers In Plant Science*, 11.
- Lindemose, S., O'Shea, C., Jensen, M. K., y Skriver, K. (2013). Structure, function, and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 5842–5878.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method'. *Methods*, 25(4), 402–408
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sánchez Serrano, J. J., y Solano, R (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant cell*, 16, 1938-1950.
- Malitsky, S., Blum, E., Less, H., Venger, I., Elbaz, M., Morin, S. et al. (2008). The Transcript and Metabolite Networks Affected by the Two Clades of Arabidopsis Glucosinolate Biosynthesis Regulators. *Plant Physiology*, 148(4), 2021-2049.
- Martínez-Ballesta, M., Moreno-Fernández, D., Castejón, D., Ochando, C., Morandini, P., y Carvajal, M. (2015). The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on water transport under salt stress in Arabidopsis thaliana. *Frontiers In Plant Science*, 6.
- Meena, K., Sorty, A., Bitla, U., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A. et al. (2017). Abiotic Stress Responses and Microbe-Mediated Mitigation in Plants: The Omics Strategies. *Frontiers In Plant Science*, 8.
- Mikkelsen, M. D., Hansen, C. H., Wittstock, U., y Halkier, B. A. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem*, 275(43):33712-7.
- Mitreiter, S., y Gigolashvili, T. (2020). Regulation of glucosinolate biosynthesis. *Journal Of Experimental Botany*, 72(1), 70-91.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

- Ng, D., Abeysinghe, J., y Kamali, M. (2018). Regulating the Regulators: The Control of Transcription Factors in Plant Defense Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3737.
- Pieterse, C., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., y Van Wees, S. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 489-521.
- Pfaffl, M., Horgan, G., y Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), 36e-36.
- Pott, D., Osorio, S., y Vallarino, J. (2019). From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived from the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. *Frontiers In Plant Science*, 10.
- Rehrig, E., Appel, H., Jones, A., y Schultz, J. (2014). Roles for jasmonate- and ethylene-induced transcription factors in the ability of Arabidopsis to respond differentially to damage caused by two insect herbivores. *Frontiers In Plant Science*, 5, 407.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., & Weng, W. et al. (2019). Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2479.
- Santner, A., y Estelle, M. (2007). The JAZ Proteins Link Jasmonate Perception with Transcriptional Changes. *The Plant Cell*, 19(12), 3839-3842.
- Shigenaga, A., y Argueso, C. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 56, 174-189.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., y Siuzdak, G (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779-787.
- Sønderby, I.E., Hansen, B.G., Bjarnholt, N., Ticconi, C., Halkier, B. A y Kliebenstein, D (2007). A Systems Biology Approach Identifies a R2R3 MYB Gene Subfamily with Distinct and Overlapping Functions in Regulation of Aliphatic Glucosinolates. *PLOS ONE*, 2 (12): e1322

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

- Staswick, P. E., Su, W., y Howell, S. H (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89 (15), 6837–6840.
- Staswick, P. y Tiryaki, I. (2004). The Oxylipin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127.
- Steibel, J., Poletto, R., Coussens, P., y Rosa, G. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, 94(2), 146-152.
- Sun, J. Y., Sønderby, I. E., y Halkier, B. A., (2009). Non-Volatile Intact Indole Glucosinolates are Host Recognition Cues for Ovipositing *Plutella xylostella*. *J Chem Ecol* 35, 1427–1436.
- Suza, W. P. y Staswick, P. E. (2008). The role of JAR1 in Jasmonoyl-L-isoleucine production during Arabidopsis wound response. *Planta* 227,1221–1232.
- Tamaoki, M. (2008). The role of phytohormone signaling in ozone-induced cell death in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 3(3), 166-174.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., y Rozen, S. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115-e115.
- Wasternack, C., y Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. *Annals Of Botany*, 111(6), 1021-1058.
- Wei, x., Guan, w., Yang, y., Shao, y., y Mao, l. (2021). Methyl jasmonate promotes wound healing by activation of phenylpropanoid metabolism in harvested kiwifruit. *Postharvest Biology And Technology*, 175, 111472.
- Wink, M. (2016). Evolution of Secondary Plant Metabolism. *Els*, 1-11.
- Wu, Y., Zhang, D., Yan Chu, J., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V., y Després, C (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep*, 1, 639-647.

## Regulación del metabolismo secundario en *A. thaliana*

- Xu, J., Chen, Y., Qian, L., Mu, R., Yuan, X., Fang, H. et al. (2017). A Novel RNA-Binding Protein Involves ABA Signalling by Post-transcriptionally Repressing ABI2. *Frontiers In Plant Science*, 8.
- Yadav, V., Wang, Z., Wei, C., Amo, A., Ahmed, B., Yang, X., y Zhang, X. (2020). Phenylpropanoid Pathway Engineering: An Emerging Approach towards Plant Defense. *Pathogens*, 9(4), 312.
- Yang, L., Wen, K.-S., Ruan, X., Zhao, Y.-X., Wei, F., y Wang, Q. (2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Zandalinas, S., Sales, C., Beltrán, J., Gómez-Cadenas, A., y Arbona, V. (2017). Activation of Secondary Metabolism in Citrus Plants Is Associated to Sensitivity to Combined Drought and High Temperatures. *Frontiers In Plant Science*, 7.
- Zandalinas, S., Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., y Arbona, V. (2012). A Fast and Precise Method to Identify Indole Glucosinolates and Camalexin in Plants by Combining Mass Spectrometric and Biological Information. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 60(35), 8648-8658.
- Zhang, D., Song, Y., Dai, R., Lee, T., y Kim, J. (2020). Aldoxime Metabolism Is Linked to Phenylpropanoid Production in *Camelina sativa*. *Frontiers In Plant Science*, 11.
- Zhao, Y., Hull, A. K., Gupta, N. R., Goss, K. A., Alonso, J.Ecker, J. R., Normanly, J., Chory, J. y Celenza, J. L (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: Involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev*, 16, 3100–3112.