



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Caracterización molecular del papel del reloj
circadiano en la defensa frente a patógenos
mediada por ácido jasmónico**

Juan Manuel Acién Luque

Trabajo Final de Máster

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas



Directora:

María Ángeles Nohales Zafra

Tutor UPV

Francisco José Vera Sirera

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 El reloj circadiano.....	5
1.2 Circuitos transcripcionales	7
1.3 Interacción entre el reloj y el estrés biótico.	8
1.4 La ruta de señalización del ácido jasmónico.	10
1.5 Actividad de GIGANTEA en los procesos fisiológicos.	12
1.6 Trabajos previos e hipótesis.....	14
2. OBJETIVOS	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.1 Interacción <i>in vitro</i>	18
3.2 Evaluación fisiológica.....	21
3.3 Análisis de la expresión.....	23
3.4 Ensayo de transactivación.	28
3.5 Ensayo de la estabilidad proteica en <i>N. benthamiana</i>	29
4. CONCLUSIÓN.....	32
5. MATERIALES Y METODOS	33
5.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.....	33
5.2 Genotipado de las líneas.	33
5.3 Construcción de los vectores binarios	34
5.4 Extracción de RNA y RT-qPCR	35
5.5 Expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i>	35
5.6 Ensayo de doble híbrido.....	36
5.7 Análisis de la acumulación y estabilidad proteica	36
5.8 Ensayo de transactivación.	36
5.9 Co-inmunoprecipitación <i>in vitro</i>	37

5.10 Medidas fisiológicas (longitud de hipocótilos)	37
5.11 Análisis bioinformático y estadístico	37
6. BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

La duración de las horas de luz y oscuridad es una señal importante en la determinación de distintos procesos fisiológicos y del desarrollo. El reloj circadiano es un mecanismo molecular que permite a los organismos medir el tiempo y anticiparse a los ciclos de luz-oscuridad que ocurren a lo largo del día. Desde un punto de vista ecológico, se entiende que esta capacidad de anticipación conferida por el reloj circadiano permite a los organismos optimizar el aprovechamiento de los recursos disponibles, siendo capaces de destinar dichos recursos a aquellos procesos más relevantes en cada momento del día. El reloj circadiano de las plantas regula el funcionamiento de una gran cantidad de procesos fisiológicos, pero en muchos casos se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes. Así, el presente trabajo se centra en el estudio de la regulación circadiana de la defensa frente a patógenos a nivel molecular a través del estudio de conexiones específicas entre un componente clave del reloj circadiano en plantas y elementos centrales de la ruta de señalización del ácido jasmónico (JA). Se hipotetiza que la modulación de la actividad de dichos elementos señalizadores por parte del reloj podría contribuir a la temporalización de la respuesta a patógenos mediada por JA a lo largo del día y, por tanto, a la adaptación de las plantas al ambiente.

Palabras claves: GIGANTEA (GI), reloj circadiano, JASMONATE ZIM (JAZ), ácido jasmónico (JA).

ABSTRACT

The Earth's rotation on its own axis has promoted the evolution of the circadian clock as a molecular mechanism that allows organisms to measure time and anticipate the light-dark cycles occurring throughout the day. On an ecological level, it is understood that this capacity for anticipation conferred by the circadian clock allows organisms to optimize the use of available resources, being able to allocate those resources to the most relevant processes at each moment of the day. The circadian clock in plants regulates many physiological processes, including many of agronomic interest, but in many instances the underlying molecular mechanisms are not known. Thus, the present work focuses on the study of the circadian regulation of the defense response against pathogens at the molecular level through the study of specific connections between a key component of the circadian clock in plants and central elements of the jasmonic acid (JA) signaling pathway. It is hypothesized that the modulation of the activity of these signaling elements by the clock could contribute to the gating of JA-mediated responses to pathogens across the day and, therefore, to plant adaptation to the environment.

Keywords: GIGANTEA (GI), circadian clock, JASMONATE ZIM (JAZ), jasmonic acid (JA).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El reloj circadiano

La rotación de la tierra provoca ritmicidad en las condiciones ambientales tales como la salida del sol y la temperatura, entre otros factores medioambientales. Estas oscilaciones ambientales durante el día provocan grandes cambios fisiológicos en el comportamiento y en el metabolismo de los seres vivos (McWatters & Eriksson, 2016). Durante la evolución, los organismos han desarrollado un mecanismo interno para medir el tiempo en menor o mayor medida, permitiéndoles anticiparse y ajustarse biológicamente a determinados fenómenos como los ciclos luz-oscuridad. Estos mecanismos son los llamados relojes circadianos, que están presentes en todos los dominios (Bacteria, Arquea y Eucariota) y tienen unas propiedades básicas que son: endógenamente automantenidos y pueden corregirse por los factores ambientales, pero poseen mecanismos para compensar ligeros cambios, como de temperatura. La variación en la respuesta del reloj a las señales ambientales durante el día se conoce como temporalización o 'gating', e implica que, dependiendo del estímulo y el momento del día, la respuesta del reloj será diferente, variando según la fase del reloj (Greenham & McClung, 2015).

Los mecanismos moleculares de los relojes circadianos se basan en bucles de retroalimentación a nivel transcripcional y traduccional, incluyendo este último las modificaciones a nivel post-transcripcional y el reciclado de proteínas. La estructura del reloj a nivel global está conservada entre los diferentes reinos eucarióticos, pero, debido a su evolución independiente en cada uno de ellos, los componentes específicos son distintos y no se han identificado ortólogos entre reinos (Greenham & McClung, 2015).

Centrándonos en el conocimiento actual que tenemos del sistema circadiano en plantas, la mayoría de los estudios están realizados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Una de las características propias del reino vegetal es la prevalencia de elementos represores, estando presentes también en la regulación del ciclo circadiano.

Debido a su naturaleza sésil, tanto la correcta recolección de señales ambientales como la integración de estas se vuelve crucial en las plantas. El mecanismo central del reloj se sincroniza con las señales ambientales permitiendo transferir esta información a otras redes de regulación que controlan procesos vitales como el crecimiento, el metabolismo o las respuestas a estrés tanto abiótico como biótico (Nohales & Kay, 2016).

Uno de los estímulos más influyentes en el funcionamiento del reloj es la luz, cuya intensidad y longitud de onda afectan a numerosos procesos biológicos como la transcripción, la estabilidad de RNAs mensajeros o la estabilidad de proteínas. A su vez, el reloj circadiano regula la expresión de los fotorreceptores

y otros componentes de la señalización por luz que permiten ajustar la sensibilidad del reloj a la luz (Fankhauser & Staiger, 2002).

La temperatura es otro factor ambiental clave para la regulación del reloj y la exposición a altas y bajas temperaturas afectan la expresión de los componentes del reloj. Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos de compensación para mantener el ritmo del reloj estable en un rango de temperaturas (James et al., 2012).

Los primeros modelos del reloj circadiano en plantas surgen a finales de los 90, describiendo el funcionamiento de los bucles de retroalimentación. Los primeros estudios se basaron en la pérdida de función de dos genes centrales del reloj, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (*LHY*), que son factores de transcripción con un dominio MYB que se expresan al amanecer. La pérdida de función individual de cada uno produce un acortamiento del ciclo. Pero el doble mutante confiere arritmicidad al igual que la sobreexpresión de cada uno de estos dos genes, lo que permitió establecer que ambos genes actúan redundantemente y son componentes centrales del reloj. *CCA1* y *LHY* forman un heterodímero que se une al promotor del gen *TIMING OF CAB EXPRESSION 1* (*TOC1*) (cuya pérdida de función y sobreexpresión presenta un fenotipo similar al caso de *CCA1* y *LHY*) provocando la represión de la expresión de este gen. Analizando el mutante *toc1-2* se observó que la expresión de *CCA1* y *LHY* se reducía, infiriéndose así un papel de regulación positiva y suponiendo el primer bucle de retroalimentación identificado en plantas (McWatters & Eriksson, 2016). Durante los últimos años se han ido identificando diferentes componentes adicionales del reloj e interconexiones con otras rutas (Figura 1).

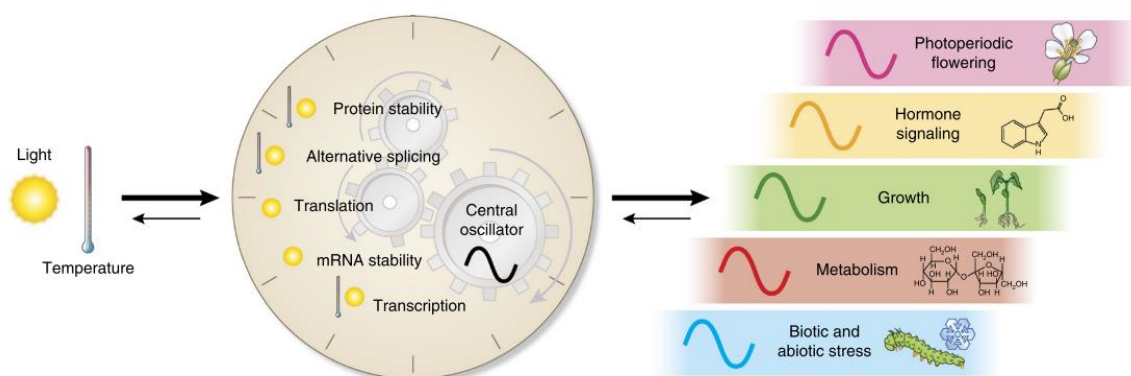


Figura 1: Esquema del funcionamiento del oscilador central en plantas. El reloj circadiano es capaz de integrar señales ambientales como luz y temperatura, influyendo en diferentes procesos fisiológicos del desarrollo de las plantas tales como la señalización hormonal, el crecimiento o el estrés (Nohales & Kay, 2016).

1.2 Circuitos transcripcionales

Como se ha comentado anteriormente, el funcionamiento del reloj se basa en bucles de retroalimentación negativos entre los diferentes componentes dependiendo del momento del día, conectándose mediante la represión recíproca entre los componentes. El complejo CCA1/LHY actúa de forma negativa sobre la expresión de los genes del anochecer mediante la unión a un motivo de regulación tipo *cis* en los promotores de estos genes llamado elemento del anochecer (Evening Element, EE). CCA1 y LHY también reprimen transcripcionalmente a la familia de genes a la que pertenece *TOC1*, los *PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRRs)*, los cuales se van expresando secuencialmente durante el día. Los *PRRs* y *TOC1* reprimen al complejo CCA1-LHY, consiguiendo mantener la expresión del complejo solo alrededor de la mañana (Nohales & Kay, 2016).

En la búsqueda de nuevos componentes del reloj, se encontraron los factores de transcripción *REVEILLE (RVE)*, los cuales se expresan durante la mañana. Estos también pueden unirse a los motivos EE pero inducen la expresión de los genes del anochecer que tienen este motivo (Hsu & Harmer, 2014).

Durante el atardecer, cuando el complejo CCA1 y LHY está inhibido, se expresa GIGANTEA (GI), que es una proteína específica de plantas sin dominios funcionales caracterizados y de gran tamaño. La expresión del gen *GI* es reprimida por *TOC1* y el complejo del anochecer (Evening Complex, EC) y, a su vez, *GI* promueve la transcripción de los genes del complejo EC así como de *CCA1* y *LHY* (Nohales & Kay, 2016). Al igual que otros genes del reloj, *GI* tiene un amplio papel regulador más allá del oscilador central del reloj, que luego se comentará. En el contexto del oscilador central, una de las actividades más importantes que lleva a cabo *GI* es la estabilización de la proteína ZEITLUPE (ZTL), que se encarga de regular negativamente a *TOC1* y *PRR5*, promoviendo indirectamente la expresión del complejo EC. Por su parte, el complejo EC está formado por tres genes, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* y *LUX*, y actúa principalmente reprimiendo a los *PRRs*, *GI* y otros genes del reloj (Hsu & Harmer, 2014).

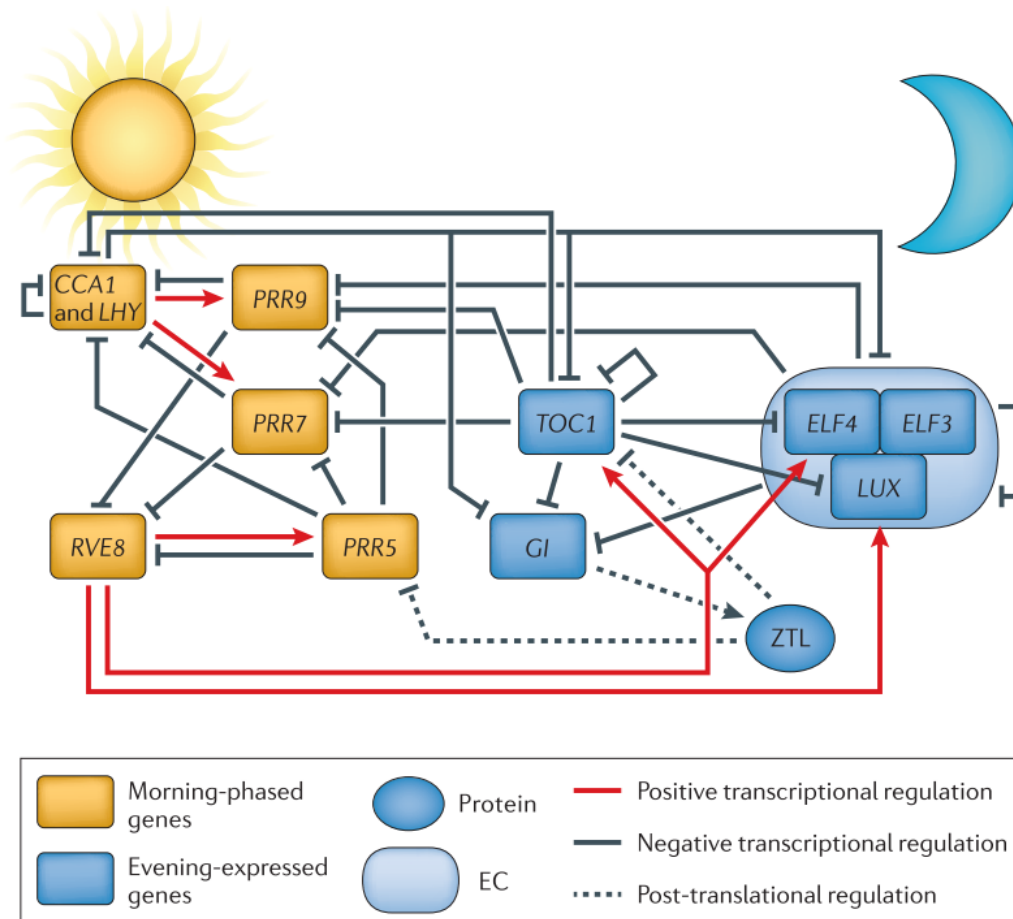


Figura 2: Modelo del reloj circadiano en *Arabidopsis thaliana*. Red regulatoria del oscilador central del reloj circadiano, mostrando los genes más importantes del oscilador: el complejo CCA1-LHY actúa por la mañana positivamente sobre PRR7 y PRR9, estos a su vez reprimen la actividad de CCA1-LHY y RVE8. RVE8 por su parte actúa positivamente sobre los genes del anochecer como TOC1 y el complejo EC, ELF4-ELF3-LUX. TOC1 tiene un papel muy importante, ya que actúa como represor en los demás componentes del oscilador. El complejo EC actúa negativamente sobre TOC1, el complejo CCA1-LHY y GI. GI a su vez actúa positivamente sobre ZTL mediante regulación post-traduccional, que regula negativamente a PRR5 y TOC1 a nivel proteico (Greenham & McClung, 2015).

Si bien la figura 2 muestra un esquema general del funcionamiento del oscilador, esta versión simplificada del oscilador central del reloj circadiano se puede complicar mucho debido a la regulación post-transcripcional y a la variación existente entre tipos de tejidos y células (Perales & Más, 2007). Sin embargo, muchos de los mecanismos implicados en estos procesos todavía no se han determinado.

1.3 Interacción entre el reloj y el estrés biótico.

El reloj circadiano cumple un importante papel a la hora de permitir determinadas respuestas a estímulos, determinando tanto su magnitud como el número de respuestas que se generan dependiendo del momento del día, pudiendo tener más influencia que el propio estrés o estímulo (Greenham & McClung, 2015). En

este apartado, nos vamos a centrar en el papel del reloj en el estrés biótico, el cual podría estar implicado en balancear la ratio crecimiento-defensa. En condiciones ecológicas naturales, las plantas tienen que sobrevivir a una gran cantidad de patógenos y herbívoros con diferentes estilos de vida. Sin embargo, la implementación de los mecanismos de defensa necesarios supone el uso de una gran cantidad de recursos de la planta en detrimento de otros procesos fisiológicos imprescindibles. Las plantas han optimizado por tanto el uso de los recursos según el ecosistema que habitan, ya que el incremento del crecimiento por sí solo no significa un mayor fitness (Züst & Agrawal, 2017).

En plantas existen tres hormonas que participan en la defensa de la planta: el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), aunque este último no tiene un papel principal y algunas revisiones no lo consideran una hormona de la defensa. La ruta de defensa del SA actúa en defensa frente a patógenos biotrófos en general, mientras que la ruta del JA es inducida por herbívoros y patógenos necrótrofos, patógenos contra los cuales también actúa el etileno. Ambas rutas, la del SA y la del JA, parecen tener un papel antagonista en la defensa (Huot et al., 2014), estando coordinadas por el reloj circadiano. El reloj permite establecer una expresión basal más alta de una de las rutas según el momento día, permitiendo en la naturaleza adaptarse al momento donde la amenaza de patógenos o herbívoros es más alta y optimizando así los recursos de la planta. El primer gen que se identificó en este sentido fue *PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1 (PCC1)*, que presenta una fase de expresión máxima al anochecer y se induce fuertemente por la infección de *Pseudomonas syringae*. Además, análisis transcriptómicos en *A. thaliana* sugieren que la expresión de los genes de la biosíntesis y la ruta de señalización tanto de JA como de SA está de alguna manera regulada por el ciclo (Greenham & McClung, 2015; Sauerbrunn & Schlaich, 2004). Consistentemente, la acumulación de ambas hormonas ocurre rítmicamente a lo largo del día: en el caso del JA el pico de acumulación ocurre al medio día, mientras que el del SA tiene lugar hacia la mitad de la noche. En *A. thaliana*, se ha observado que el pico de acumulación del JA concuerda con el momento del día en el que las orugas de la col (*Trichoplusia ni*) tienen una mayor actividad, lo que resulta en un menor daño provocado (Figura 3A, 3B y 3C). Al poner en contacto plantas y orugas entrenadas en distintas fases, se observó que las plantas eran prácticamente devoradas por las orugas, de igual manera que ocurría al analizar el efecto sobre plantas mutantes para genes del reloj, arrítmicas. Estas evidencias ponen de manifiesto la relevancia del correcto funcionamiento del reloj en la preparación de la defensa (Goodspeed et al., 2012).

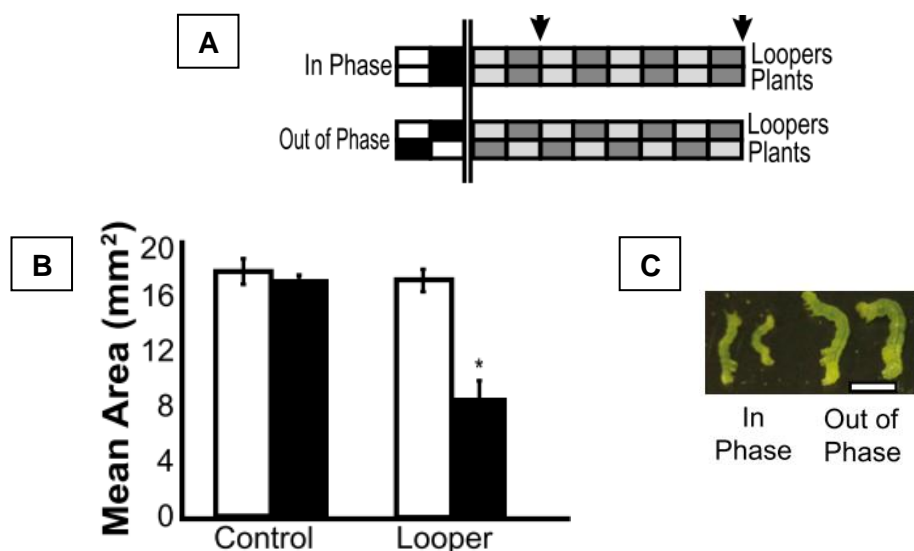


Figura 3: Importancia de la ritmicidad en la defensa. En la respuesta de la planta al ataque por la oruga *Trichoplusia ni*, si las plantas están en una fase distinta (A) a la de la oruga, el daño provocado por la oruga es mucho mayor (B) y, por tanto, el crecimiento del insecto es también mayor (C) (Goodspeed et al., 2012).

En estudios sobre la regulación temporal de la ruta del ácido salicílico se ha encontrado la implicación del factor de transcripción CCA1 HIKING EXPEDITION (CHE), un componente del oscilador central del reloj, en la inducción de la expresión de la enzima *ISOCORISMATO SINTETASA 1 (ICS1)*, clave en la biosíntesis del ácido salicílico. El papel de CHE no se limita a la inducción cíclica de esta enzima, sino que también participa en la acumulación de SA en la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Zheng et al., 2015).

Aunque se ha demostrado la importancia del reloj circadiano en el estrés biótico, todavía no se conocen completamente los mecanismos moleculares por los que el oscilador central interviene en estas rutas.

1.4 La ruta de señalización del ácido jasmónico.

Tanto el ácido jasmónico como sus derivados son hormonas vegetales, todos ellos derivados de los ácidos grasos. Inicialmente, se identificaron como moléculas de señalización exclusivamente de defensa. Sin embargo, desde su identificación, se ha descubierto que tienen un papel relevante en muchos otros procesos fisiológicos, como la determinación sexual o la elongación de la raíz. Y se ha comprobado la relevancia de su señalización cuando las plantas deciden parar el crecimiento y aumentar los mecanismos de defensa, dando lugar a una reprogramación transcripcional de las células (Fonseca et al., 2009; Pauwels et al., 2008).

Los factores de transcripción encargados de la inducción de genes de la ruta de los jasmonatos son MYC2, MYC3 y MYC4. Estos factores de transcripción son tipo bHLH que se une a los dominios caja G o T/G promoviendo la transcripción

de los genes regulados positivamente por JA. MYC2 se ha encontrado como el principal componente (Chini et al., 2016; Pauwels & Goossens, 2011; Thireault et al., 2015).

Estos factores de transcripción se encuentran reprimidos en ausencia de JA por las proteínas JAZs (JASMONATE ZIM DOMAIN). Los JAZ son represores de la actividad transcripcional de la respuesta al JA. En *Arabidopsis* existen 12 miembros de la familia y pertenecen a la superfamilia TIFY. Existe cierta redundancia entre los diferentes miembros de la familia, aunque cada uno de ellos tiene una expresión específica del tipo de tejido o célula. Las proteínas JAZ cuentan con dos dominios conservados: Jas, en el C-terminal, el cual permite la interacción con MYC, y ZIM, en la parte central de la proteína, que principalmente permite la interacción con otros JAZs generando heterodímeros funcionales.

El JA, como hormona derivada de los ácidos grasos, se sintetiza en el cloroplasto y el peroxisoma, dando el (+)-7-iso-JA. Esta molécula es inestable y es conjugada a aminoácidos como la isoleucina por la enzima JAR1 (JASMONATE RESISTANT 1). En esta forma conjugada es transportada al núcleo donde marca a los JAZs para su degradación. La respuesta en el núcleo es dependiente del complejo multiproteico SCF (SKIP-CULLIN-F-box), que son E3 ubiquitin ligasas que catalizan la ubiquitinación de proteínas para su degradación por el proteosoma 26S. En general, los componentes que confieren la especificidad a los complejos SCF son las proteínas con caja F (proteínas *F-box*), que en el caso de la respuesta a JA es la proteína COI1 (CORANATINE-INSENSITIVE PROTEIN 1). Esta proteína es capaz de reconocer el dominio Jas común a las proteínas JAZ en presencia del JA y marcarlas para su degradación por el proteosoma (Fonseca et al., 2009; Pauwels & Goossens, 2011). Por tanto, en presencia de JA, los JAZs son degradados y se liberan los factores de transcripción reprimidos por los JAZ como son MYC2, MYC3 o MYC4 (Figura 4) (Chini et al., 2016; Pauwels & Goossens, 2011; Thireault et al., 2015).

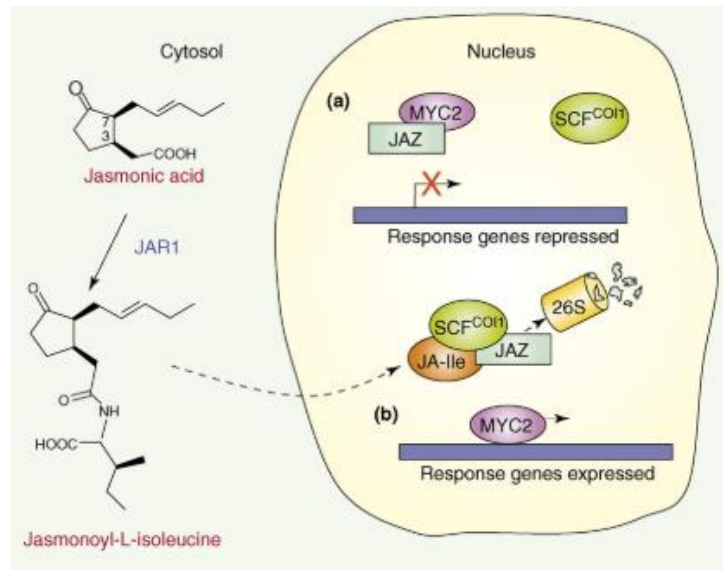


Figura 4: Ruta de señalización del ácido jasmónico. El JA es conjugado a aminoácidos como la Isoleucina por la enzima JAR1, permitiendo una mayor estabilidad. JA-ILE en el núcleo se une al complejo multiproteico SCF-CO1, que es el que da la especificidad para unirse a los JAZ y permite que las otras proteínas complejo marquen a los JAZ para la degradación. En presencia de JA, se libera el factor de transcripción MYC2 y activa la expresión de genes de respuesta a JA (Staswick, 2008).

1.5 Actividad de GIGANTEA en los procesos fisiológicos.

Respecto a GIGANTEA (GI), se trata de una proteína altamente conservada en el reino vegetal, que suele tener una sola copia del gen. Su pico de expresión a nivel proteico ocurre al principio de la noche en día corto, mientras que en día largo ocurre un poco antes. Esta proteína tiene un tamaño de 1173 aa y un peso molecular de 128 kDa, localizándose tanto en el núcleo como el citoplasma. Debido al tamaño y las múltiples interacciones con otras proteínas, es muy probable que contenga múltiples dominios. Actualmente se ha descrito un dominio en el N-terminal de la proteína, del aminoácido 46 al 426 (Black et al., 2011). La figura 5 muestra una simulación estructural hecha por *alphafold* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q9SQI2>).

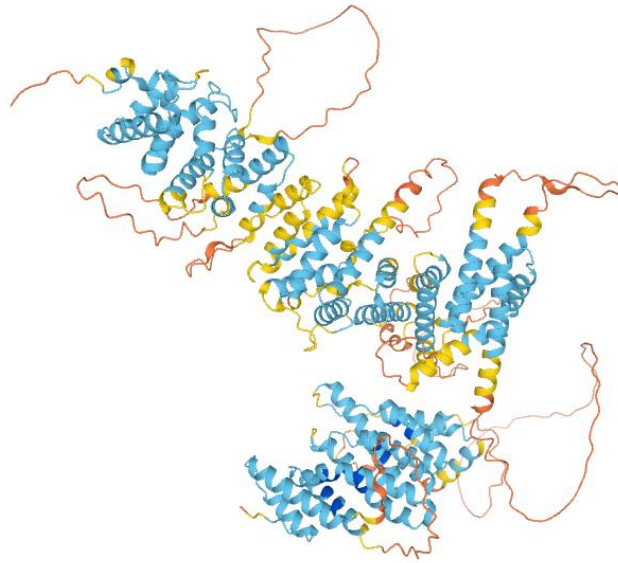


Figura 5: Modelo estructural de GIGANTEA. Modelo estructural generado por *alphafold* (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Los residuos con un color más azul significan un mayor nivel de confianza en el modelo, mientras que los residuos con colores hacia el rojo, lo opuesto.

Como se ha comentado anteriormente, la influencia de la luz es crucial para el reloj y, entre otras cosas, permite coordinar la longitud del día con el momento de la floración. GI tiene un papel crucial en este proceso, concretamente en las células acompañantes del floema donde permite la expresión de los florígenos vía la actividad del factor de transcripción CONSTANS (CO) en días largos (Greenham & McClung, 2015; Romera-Branchat et al., 2014; Song et al., 2015). En los últimos años, se ha encontrado que GI tiene un papel importante en otros procesos fisiológicos, como puede ser la respuesta a estrés abiótico (salino o hídrico), mediante la interacción con las proteínas SOS (SALT OVERLY SENSITIVE) (Figura 6A) (Kim et al., 2013). A su vez, se ha demostrado el papel de GI en la coordinación entre el fotoperíodo y el estrés hídrico, permitiendo la transición floral temprana, que se activa por el estrés pero solo durante días largos (Riboni et al., 2013).

GI también tiene un papel en la regulación del crecimiento y el desarrollo mediante la modulación de la actividad de los PIFs (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS), que son factores de transcripción que integran información de diferentes rutas celulares como luz, temperatura, hormonas y ritmo circadiano para regular el crecimiento (Figura 6B) (Nohales et al., 2019).

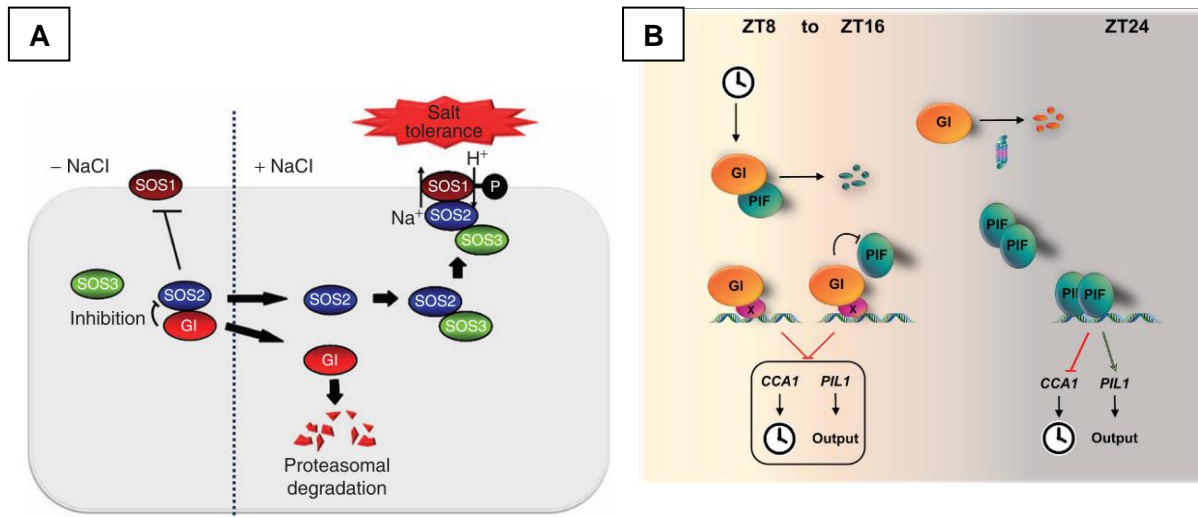


Figura 6: Diferentes procesos en los que Gl tiene un papel regulatorio. A) Gl, en condiciones de no estrés, se une a SOS2 impidiendo la unión de esta proteína a SOS3 y SOS1. En condiciones de estrés salino, Gl es degradada permitiendo la actividad de la bomba SOS1 por la unión con SOS2. B) Gl regula la actividad de PIF a dos niveles regulatorios: post-traducciona y a nivel de su actividad en la cromatina, reprimiendo la actividad de los PIF en la fase de Gl (Kim et al., 2013; Nohales et al., 2019).

1.6 Trabajos previos e hipótesis.

Se ha descrito en la literatura la implicación del reloj circadiano en la temporalización de la respuesta a JA. Concretamente, Ingle y colaboradores (Ingle et al., 2015) observaron que, dependiendo del momento del día, la susceptibilidad a la inoculación por *Botrytis cinérea* (respuesta mediada por JA) es diferente: la inoculación al amanecer provoca una menor infección o menor daño, mientras que por la noche se observa una mayor susceptibilidad. Esta respuesta diferencial desaparece en mutantes del reloj circadiano, lo que indica la implicación de éste en su regulación (Figura 7A).

En un rastreo de doble híbrido en levadura (Y2H) entre Gl y cerca de 2000 factores de transcripción de *Arabidopsis*, se encontró que Gl interactúa con diferentes proteínas JAZs (Figura 7B). Teniendo en cuenta esta interacción, así como la observación preliminar de que el mutante de *Gl*, *gi-2*, es más susceptible a determinadas patógenos como el caso del oídio, presentamos una hipótesis de trabajo en la cual Gl, mediante su interacción con los JAZ, modularía la actividad supresora de éstos sobre el factor de transcripción MYC2, regulando la expresión de los genes de defensa de la ruta del JA (Figura 8). Se hipotetiza además que éste podría ser uno de los mecanismos subyacentes a la temporalización de la respuesta a JA a lo largo del día.

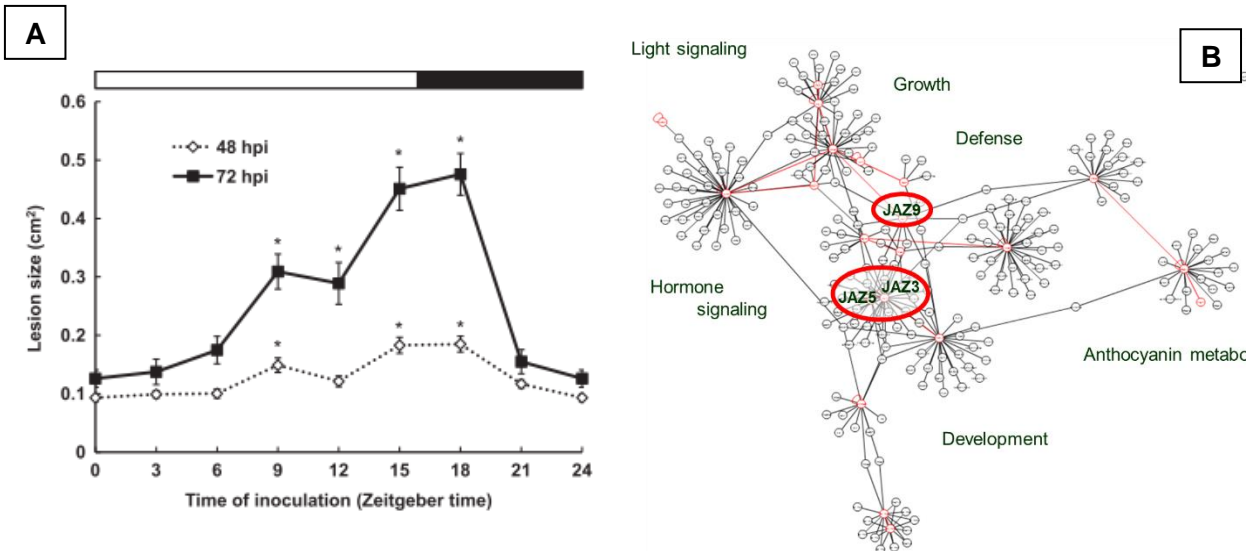


Figura 7: Trabajos previos. A) Ensayo de susceptibilidad mediante inoculación con *B. cinerae* a distintos momentos días y evaluación del daño a las 48 y 72 horas post-inoculación (Ingle et al., 2015). B) Rastreo de doble híbrido utilizando una biblioteca de factores de transcripción (Pruneda-Paz et al., 2014).

Evolutivamente, la coordinación de los procesos fisiológicos, tanto en su correcto momento como duración, ha supuesto una ventaja adaptativa para la mayoría de los organismos (Millar, 2016). En el caso del balance de la defensa, esta coordinación ventajosa se ha asociado a un proceso de regulación antagonista entre la ruta del ácido jasmónico y la del ácido salicílico, dándose prioridad a cada una de estas rutas dependiendo del momento del día y adelantándose por tanto al ataque de determinados patógenos (Campos et al., 2016; Yang et al., 2012). En este sentido, la función de GI contribuiría a esta temporalización de los mecanismos de defensa y, por tanto, la adaptación de *Arabidopsis*.

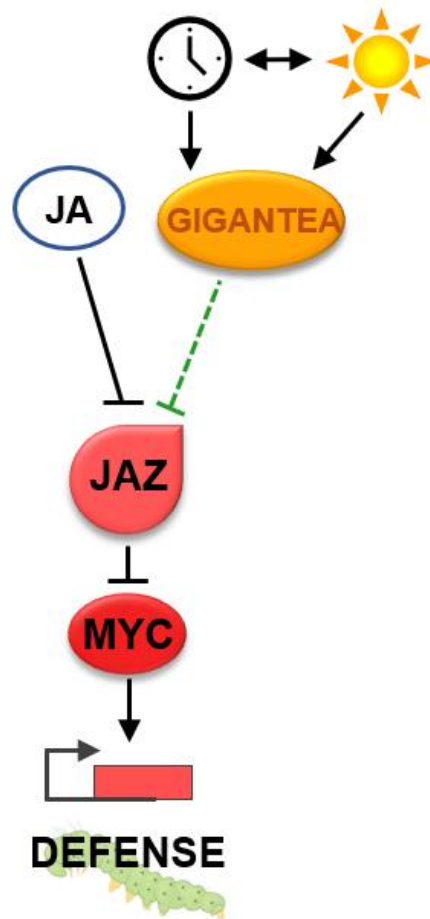


Figura 8: Hipótesis de trabajo sobre el papel regulatorio ejercido por GI en la defensa. En el esquema se muestran las interacciones ya demostradas en línea continua y las hipotéticas, en líneas discontinuas.

2. OBJETIVOS

Para este Trabajo de Fin de Máster se establecieron los siguientes objetivos:

- Caracterizar la posible interacción entre GI y distintas proteínas JAZs, así como con el factor de transcripción MYC2, controlado por los JAZ.
- Estudiar el mecanismo molecular subyacente a la posible función de GI en la ruta de defensa mediada por el ácido jasmónico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Interacción *in vitro*

En nuestro rastreo preliminar de doble híbrido, se identificó la interacción entre GI y JAZ3 (coeficiente de inducción (CI) 5.523), JAZ9 (CI 4.953), JAZ10 (CI 4.304), JAZ5 (CI 3.435), JAZ11 (CI 3.189) y JAZ4 (CI 2.840). Tras examinar el patrón de expresión diurna de los diferentes JAZ que interactúan con GI en la base de datos DIURNAL (Tabla 1), y debido al alto nivel de redundancia entre los JAZ, se decidió considerar JAZ3, JAZ5, JAZ9 y JAZ10 para futuras investigaciones. La expresión del gen *GI* es máxima 8 h tras el amanecer (Zeitgeber Time (ZT) 8) en fotoperíodos de día corto (SD), pero sus niveles de proteína son más altos posteriormente, a ZT10-12. Además, es durante la fase nocturna cuando se ha descrito que GI ejerce un importante papel en la regulación transcripcional (Nohales et al., 2019). Por lo tanto, GI coincide en tiempo de expresión y actividad con los niveles máximos de JAZ3, JAZ5, JAZ9 y JAZ10 (Tabla 1).

ID	Locus	Fase	Correlación	Inducción
JAZ3	AT1G17380	8	0.428518	5,523
JAZ4	AT1G48500	5	0,857907	2,84
JAZ5	AT1G70700	22	0.79713	3,435
JAZ9	AT3G17860	23	0.69954	4,953
JAZ10	AT5G13220	12	0.754936	4,304

Tabla 1: Patrón de expresión diurno de los JAZ que interactúan con GI en el rastreo de doble híbrido. Datos extraídos de la base de datos DIURNAL, en la que no aparece JAZ11. (<http://diurnal.mocklerlab.org>).

Con el fin de confirmar los resultados del rastreo de doble híbrido, se clonaron las cDNAs de JAZ3, JAZ5, JAZ9, JAZ10 y MYC2 en el vector pGADT7 y el cDNA de GI en pGBKT7, co-transformando las distintas combinaciones pGADT7/pGBKT7 en la cepa de levadura AH109. Tras el goteo en placas de SD (-Leu -Trp -His) en concentraciones crecientes de 3-AT (0, 2.5, 5, 10 mM) (figura 9), se confirmó la interacción entre GI y los diferentes JAZ. En cambio, como se puede observar en la figura 5, GI no interactúa con MYC2 en levadura.

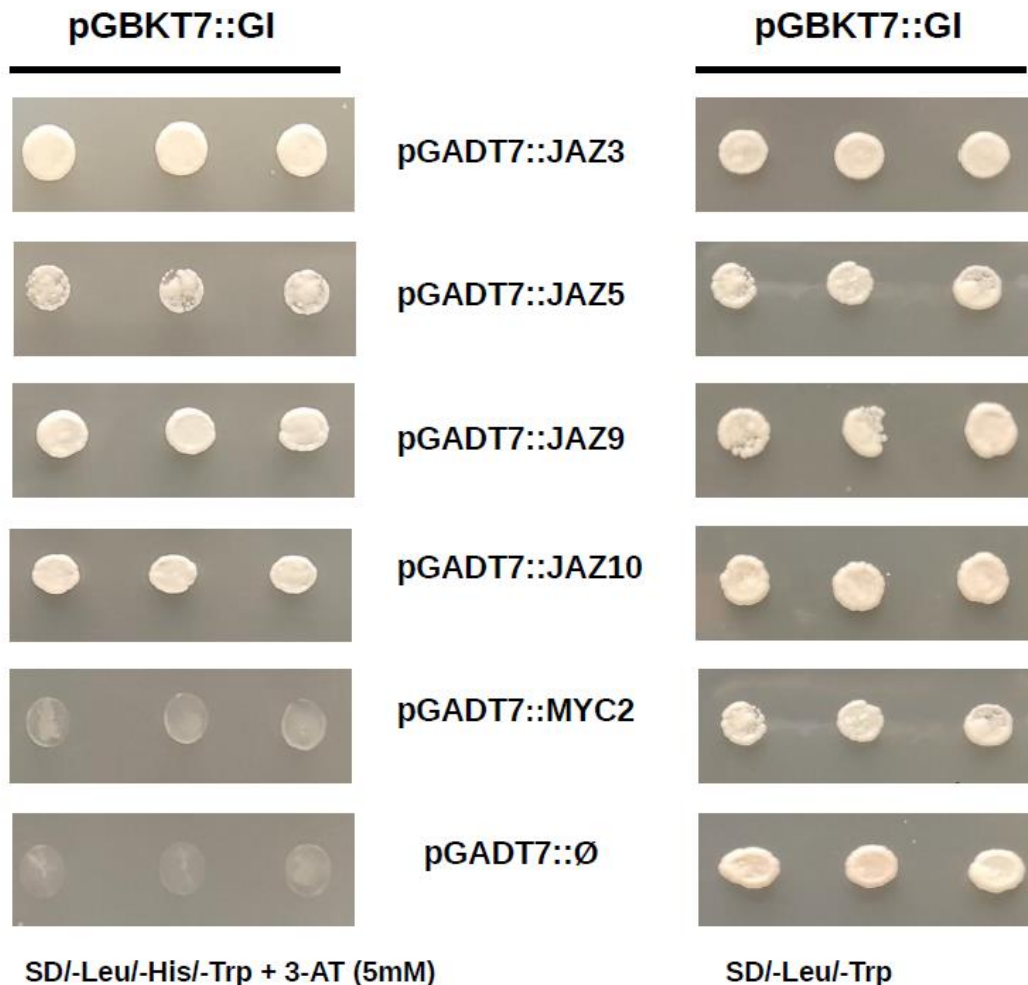


Figura 9: Ensayo de doble híbrido. Se contransformaron GI en el vector pGBKT7 y JAZ3, 5, 9,10 y MYC2 en el vector pGADT7; como control negativo se empleó el vector pGADT7 vacío. A) Medio de selección SD/-Leu/-His/-Trp + 3-AT (5mM). B) Medio de crecimiento SD/-Leu/-Trp. A y B, se muestra el crecimiento de tres réplicas biológicas independientes.

Teniendo en cuenta las interacciones encontradas en el ensayo de Y2H, se realizó un ensayo de co-immunoprecipitación *in vitro*, utilizando el sistema de expresión TnT®. Para ello, se clonaron los diferentes cDNAs en los vectores adecuados (ver Materiales y métodos), quedando GI etiquetada con FLAG y las demás proteínas etiquetadas con HA.

La inmunoprecipitación se realizó utilizando un anticuerpo anti-HA. Como se observa en la figura 10, GI co-inmunoprecipitó con todos los JAZs y, sorprendentemente, también con MYC2. Este resultado confirma la interacción entre GI y los distintos JAZs, y abre la puerta a una posible interacción entre GI y MYC2.

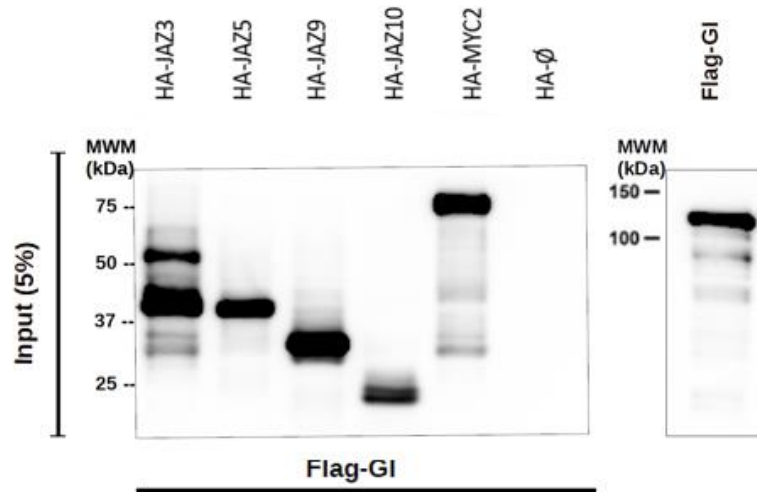
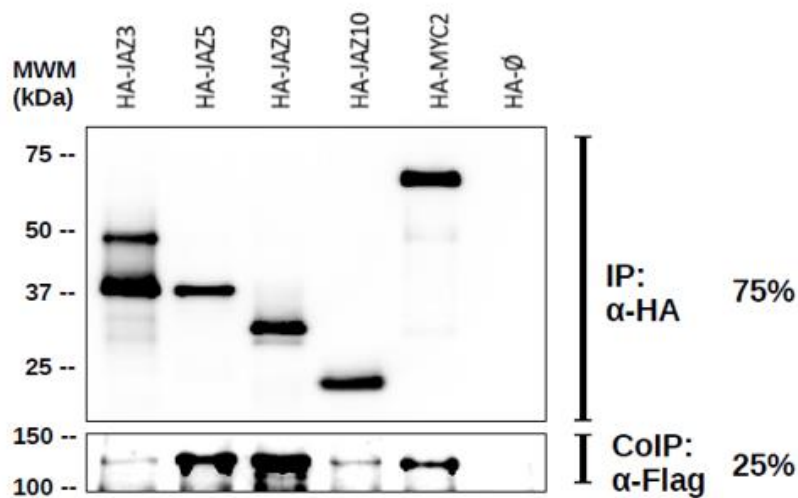
A**B**

Figura 10: Western-blot del ensayo de co-inmunoprecipitación entre GI y JAZ 3,5,9,10 y MYC2. A) Input (5% de la reacción) B) Análisis de las proteínas inmunoprecipitadas (parte superior) y co-inmunoprecipitadas (parte inferior).

Con el fin de caracterizar las interacciones observadas *in vivo*, se han cruzado líneas que sobreexpresan versiones etiquetadas de JAZ3, JAZ9 y MYC2 con líneas que expresan una versión de GI etiquetada con FLAG (Nohales et al., 2019).

Si bien ha resultado sorprendente el identificar por co-inmunoprecipitación *in vitro* la interacción entre GI y MYC2 (no detectada anteriormente por Y2H), existen antecedentes de este modo de acción de GI en la literatura. Por ejemplo, en el caso de la regulación del crecimiento vegetativo por parte de GI, se ha observado que GI reprime el crecimiento a distintos niveles, reprimiendo a los factores de transcripción PIF y estabilizando a sus represores, las proteínas DELLAs, que son elementos negativos en la ruta de señalización de las giberelinas (Nohales et al., 2019).

3.2 Evaluación fisiológica.

Para investigar la relevancia fisiológica de la interacción entre *GI* y las proteínas *JAZs*, se generaron diferentes mutantes de orden simple y superior portadoras de alelos de pérdida de función para *GI* y *JAZ*. Así, se cruzaron plantas knock-out *gi-2* con líneas mutantes *jaz3-1*, *jaz9-1*, *jaz10-1*, *jaz5-1;jaz10-1* y *jaz3-1;jaz10-1*. Las plantas F2 fueron genotipadas y se aislaron varias líneas mutantes dobles y triples, incluyendo *jaz3-1;gi-2*, *jaz9-1;gi-2*, *jaz10-1;gi-2*, *gi-2;jaz5-1(heterocigota);jaz10-1*, *jaz3-1(heterocigota);jaz10-1;gi-2* y *jaz3-1;jaz10-1(heterocigota);gi-2*.

Estas líneas se emplearon para el estudio de las interacciones génicas entre *GI* y los *JAZs*, para lo cual se midió la elongación de los hipocótilos en presencia y ausencia de JA. En ausencia de JA, se observó que los fenotipos de los mutantes *jaz* a nivel de longitud de hipocótilo no difieren de manera estadísticamente significativa del ecotipo silvestre Col-0, exceptuando *jaz3-1*, el cual tiene un crecimiento menor (Figura 11). Sin embargo, las semillas *jaz3-1* en general presentaron problemas de germinación, por lo que es posible que éste no sea un efecto directamente relacionado con la mutación. Además, como se observa en la figura 11, el doble mutante *jaz3-1;jaz10-1* presenta un crecimiento indistinguible de Col-0. En cualquier caso, se esperaba que no hubiera diferencias significativas entre Col-0 y los mutantes *jaz*, ya que, si bien la función de los *JAZ* individuales es específica de tejido y tipo celular, existe cierta redundancia funcional cuando hay pérdida de función de algunos de ellos. De hecho, es necesario analizar mutantes en múltiples genes *JAZ* para conseguir un fenotipo de intermedio a fuerte relacionado con la respuesta a JA, según esta descrito en la literatura (Chini et al., 2016; Pauwels & Goossens, 2011; Thireault et al., 2015). En cuanto a los dobles y triples mutantes *gi-2;jaz*, éstos mostraron unos valores estadísticamente iguales a los del mutante *gi*, siendo este fenotipo dominante sobre el fenotipo de los mutantes *jaz* a nivel de longitud de hipocótilo (Figura 11). Este resultado pone de manifiesto que la mutación de *GI* es epistática a la de *JAZ* en ausencia de JA.

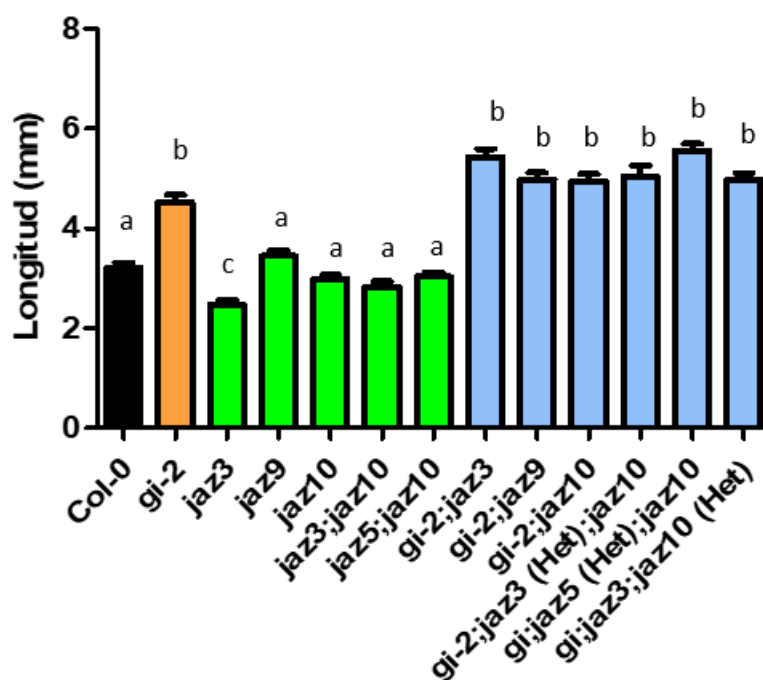


Figura 11: Longitud de los hipocótilos (mm). Hipocótilos analizados a los 7 días de crecimiento en día corto (SD). Media ($n \geq 15$) \pm SEM. Test de comparación múltiple Tukey ($p < 0,05$, letras indican grupos estadísticos).

A continuación, se midió la altura de los hipocótilos en las mismas condiciones de crecimiento, pero con un tratamiento de 50 μ M ácido jasmónico en el medio de cultivo. Los tratamientos con jasmonatos nos permiten determinar la sensibilidad de los mutantes a esta hormona y, por tanto, la reducción del crecimiento. En este experimento se observó una reducción del crecimiento tanto de Col-0 como de *gi-2*, siendo esta mayor en el caso de *gi-2*. En cuanto a los mutantes simples *jaz*, la reducción parece dependiente de la mutación del *JAZ* en cuestión: *jaz9-1* tiene un fenotipo igual a Col-0, mientras que *jaz10-1* presenta una mayor sensibilidad al tratamiento y, por tanto, una mayor reducción del crecimiento. Por otro lado, los resultados de los dobles mutantes *gi;jaz* muestran que el fenotipo corresponde al de la mutación *jaz* correspondiente. Este resultado indica que, en presencia de JA, la mutación de los *JAZ* es epistática a la de *GI* (Figura 12).

Globalmente, los resultados indican la existencia de interacciones génicas entre *GI* y los *JAZs*, y sugieren que *GI* efectivamente está implicada en la regulación de la ruta de los jasmonatos. En *gi-2* la actividad de los *JAZ* estaría sobreestimulada, posiblemente por la falta de represores. Esto sería consistente con el mayor crecimiento observado tanto en *gi-2* como en las combinaciones con los mutantes de *JAZ*. En cambio, cuando se satura el medio con ácido jasmónico, la actividad de los *JAZs* se ve completamente suprimida y *gi-2* tiene un fenotipo igual a Col-0.

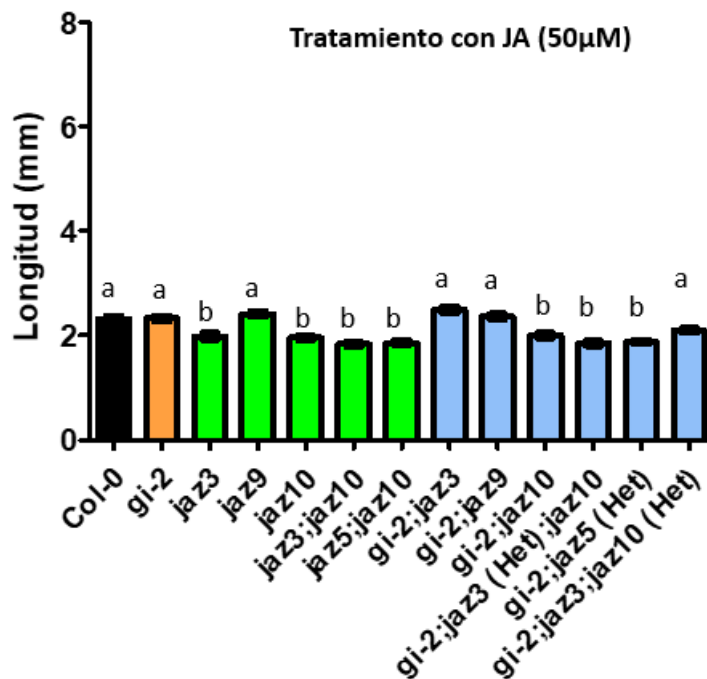


Figura 12: Longitud de los hipocótilos (mm) en presencia de JA. Hipocótilos analizados a los 7 días de crecimiento en día corto (SD). Media ($n \geq 15$) \pm SEM. Test de comparación múltiple Tukey ($p < 0,05$, letras indican grupos estadísticos).

3.3 Análisis de la expresión

Las proteínas JAZs reprimen la señalización por JA uniéndose directamente a factores de transcripción de la familia MYC, necesarios para la expresión de los genes de respuesta a JA (Chini et al., 2017; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). Por lo tanto, se investigó el efecto de GI sobre la actividad del módulo JAZ-MYC2. Con el fin de identificar dianas comunes de GI y MYC2, se realizó un metanálisis a partir de datos genómicos disponibles. Se inspeccionaron conjuntos de datos publicados de expresión génica global en mutantes *myc2;myc3;myc4* (van Moerkercke et al., 2019), así como un experimento preliminar de RNA-seq disponible en el laboratorio (datos no publicados). Dicho experimento de RNA-seq fue diseñado para analizar los genes expresados diferencialmente (DEGs) en mutantes *gi-2* de *Arabidopsis* en comparación con plantas silvestres a diferentes ZTs (0, 4, 10, 16) en fotoperíodos de día corto.

Al inspeccionar el patrón de expresión de *MYC2* en día corto en la base de datos DIURNAL, se observó que este presenta un pico de expresión máxima alrededor de ZT4 (Figura 13A). El análisis del RNA-seq del triple mutante *myc2;myc3;myc4* realizado por van Moerkercke y colaboradores (van Moerkercke et al., 2019) reveló que la mayoría de los DEGs identificados se encontraban infraexpresados en el mutante *myc2;myc3;myc4* respecto a Col-0 (Figura 13B). Con aquellos

genes diferencialmente expresados se hizo una búsqueda de los picos de expresión a lo largo del día en la base de datos DIURNAL, observándose que la gran mayoría presentan una expresión rítmica. Dentro de estos genes, se observó un enriquecimiento de la fase de máxima expresión tanto a ZT4 como a ZT6 (Figura 13C), siendo este último el que mayor enriquecimiento mostraba estadísticamente. Este patrón coincide con el momento de mayor nivel proteico de MYC2 y, por tanto, de su actividad como factor de transcripción.

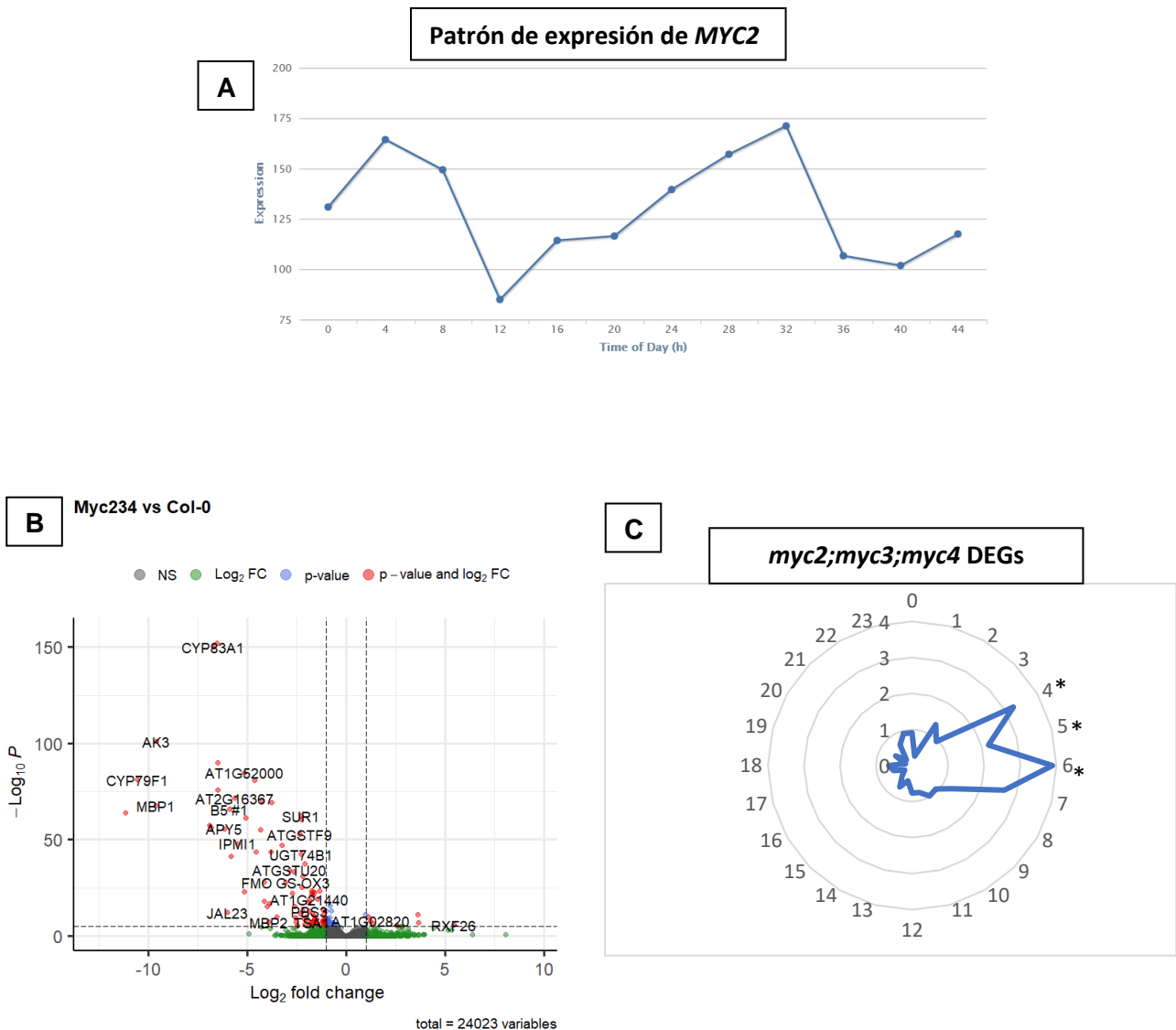


Figura 13: Análisis de MYC2 y sus dianas. A) Patrón de expresión de *MYC2* en día corto, extraído de la base de datos DIURNAL. B) VolcanoPlot del RNA-seq de *myc2;myc3;myc4*. C) Fase de máxima expresión de los DEGs en el RNA-seq de *myc2;myc3;myc4* (* indican significancia estadística). Datos extraídos de la base de datos DIURNAL.

Como se ha comentado anteriormente, para identificar los genes comunes controlados por GI y el módulo JAZ-MYC2 se compararon el RNA-seq de van

Moerkercke y colaboradores (van Moerkercke et al., 2019) con el RNA-seq del mutante *gi-2* disponible en el laboratorio. Al comparar los DEGs en el mutante *gi-2* con los del triple mutante *myc2;myc3;myc4* (Figura 14A), se observó un solapamiento significativo, especialmente ZT0 (Figura 14B), lo que podría deberse al mayor número de genes diferencialmente expresados en ese momento del día. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos anteriormente mostrados, GI podría jugar un papel en la modulación de la represión ejercida por los JAZ sobre MYC2, represión que ocurre durante la noche. Por tanto, la mutación de GI resultaría en una sobreactividad de los JAZ en ese momento del día, resultando en una menor expresión de los genes de respuesta a JA (dianas de MYC) y, por tanto, en una mayor cantidad de DEGs comunes entre el triple mutante de MYC y GI a ZT0.

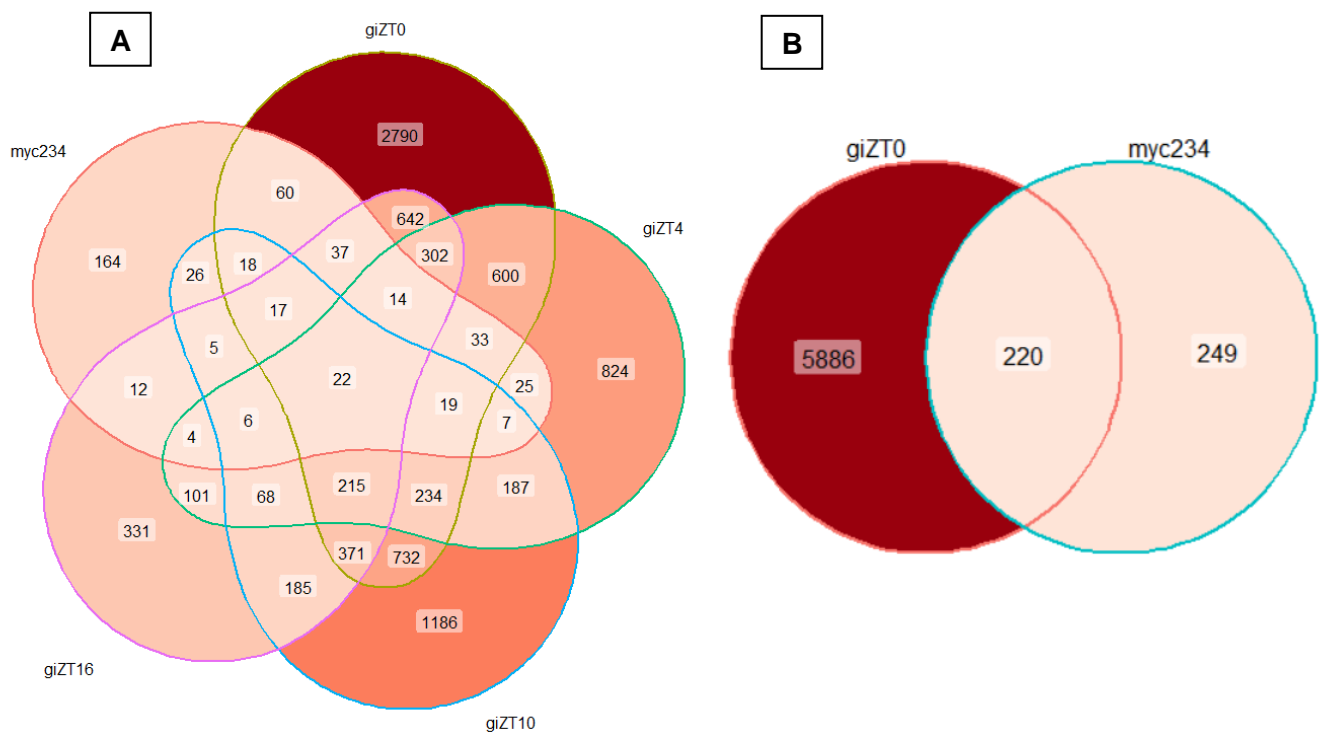


Figura 14: Diagramas de Venn entre los RNA-seq de *gi-2* y *myc2;myc3;myc4*. A) Diagrama de Venn de los DEGs entre *myc2;myc3;myc4* y *gi-2* a diferentes ZTs. B) Diagrama de Venn de los DEGs entre *gi-2* ZT0 y *myc2;myc3;myc4*.

Utilizando la herramienta web PANTHER (<http://pantherdb.org/>) se analizó las categorías de ontología génica (GO) enriquecidas en los genes compartidos entre los distintos sets. En condiciones más estrictas y analizando solo los DEGs comunes entre *myc2;myc3;myc4* y *gi-2* en los cuatro momentos del día analizados, se encontró un enriquecimiento significativo en las categorías relacionados con la función de MYC2, tales como la biosíntesis de glucosilatonos y la respuesta a insectos. Al ampliar el análisis utilizando como entrada los genes compartidos entre *myc2;myc3;myc4* y *gi-2* a ZT0 (aumentado así el número de

22 genes compartidos a 220), el número de categorías enriquecidas aumenta, incluyendo también categorías como la respuesta a nematodos, a ácido jasmónico y a herida (Tabla 2).

Proceso biológico GO	Enriquecimiento	P valor	FDR
Regulación positiva de las especies reactivas de oxígeno	62.94	3.53E-05	4.12E-03
Biosíntesis de glucosilonaos	17.91	1.47E-05	1.99E-03
Respuesta a insectos	18.36	1.01E-04	8.95E-03
Catabolismo de glucosilonaos	16.78	1.38E-04	1.13E-02
Respuesta a nematodos	8.85	3.34E-04	2.31E-02
Respuesta a Ácido Jasmónico	6.71	3.68E-05	3.98E-03
Respuesta a herida	6.14	8.21E-06	1.22E-03
Respuesta a Ácido Abscísico	5.73	5.13E-09	2.18E-06

Tabla 2: Categorías GO enriquecidas en los DEGs compartidos entre *myc2;myc3;myc4* y *gi-2* ZT0. Enriquecimiento (número de genes anotados a un término GO en el listado de DEGs versus los esperados), FDR (Tasa de falsamente rechazados).

En ambos análisis, aparecen enriquecidas categorías relacionadas con la acumulación de metabolitos secundarios o respuestas a estrés biótico como insectos o nematodos, indicando que GI ejerce un papel regulatorio sobre la expresión de los genes controlados por MYC2, ya sea mediante la regulación directa de MYC2 o mediante la modulación de la actividad represora que los JAZ ejercen sobre MYC2.

A partir de los datos extraídos del anterior análisis, se investigó con mayor detalle los niveles de expresión de dos genes diana de MYC2 bien establecidos, *BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 4 (BCAT4)* (Schuster et al., 2006) y *CYTOCHROME P450, FAMILY 79, SUBFAMILY B, POLYPEPTIDE 3 (CYP79B3)* (Naur et al., 2003).

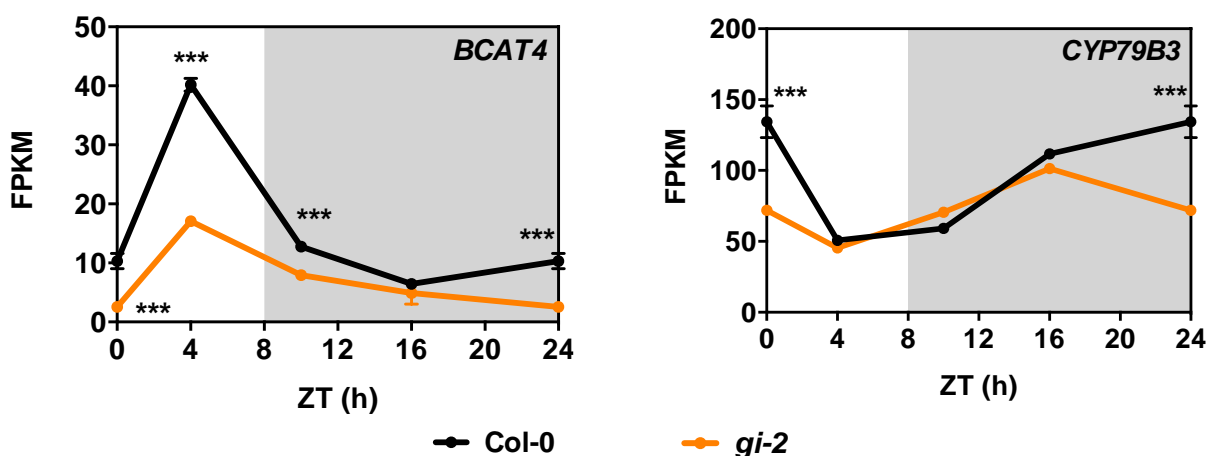


Figura 15: Niveles de expresión (fpkm) de *BCAT4* (izquierda) y *CYP79B3* (derecha) en el RNA-seq de *gi-2* vs *Col-0*. Media (n=3) ± SEM. Test ANOVA (unidireccional) (***, p<0,001).

Ambos genes están bien caracterizados como dianas de MYC2, estando involucrados en el metabolismo de los glucosinolatos y, por tanto, en la defensa de la planta frente a herbívoros (Schweizer et al., 2013). Como se puede observar en la figura 15, tanto en el caso de *BCAT4* como en el de *CYP79B3* las mayores diferencias de expresión entre el mutante de *GI* y el control (Col-0) se encuentran a ZT0, con menores niveles de expresión en *gi-2*. Esto es consistente con la hipótesis de que *GI* podría tener un papel en el control de la represión ejercida por los JAZs sobre MYC2 durante la noche, evitando que ésta sea demasiado fuerte y permitiendo así la correcta actividad de MYC2. Por eso observamos que la mayoría de las dianas comunes en los RNAseq se compartían a ZT0. Por tanto, la expresión de los genes diana comunes se ven especialmente afectados en el mutante *gi-2* al final de la noche (ZT0).

Se analizó a continuación la expresión de estos dos genes a ZT0 mediante RT-qPCR en *gi-2* en comparación con plantas silvestres (Col-0). Como se esperaba, se encontró que tanto *BCAT4* como *CYP79B3* se expresan menos en *gi-2* (Figura 16). Además, se observó que dicha represión de la expresión en *gi-2* se alivia al mutar distintos JAZs (Figura 16). Este resultado apoya la hipótesis de trabajo acerca del papel regulador que *GI* ejerce sobre la expresión de genes diana de MYC2 durante la noche, siendo probable que ocurra a través de la modulación (represión) de la actividad de JAZ en este momento. La mutación de *GI* daría lugar a una actividad JAZ excesiva sobre MYC2 y, por tanto, una menor expresión de los genes diana de MYC2.

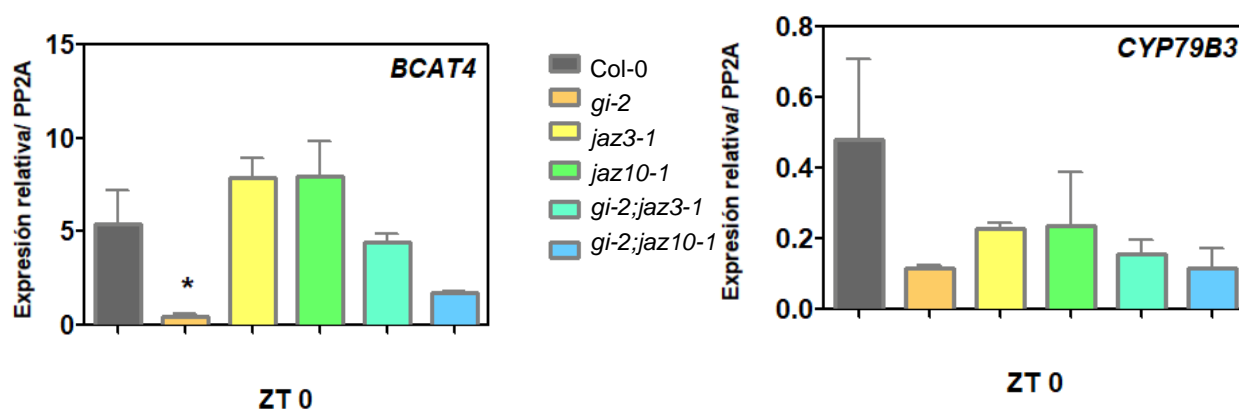


Figura 16: Expresión relativa de los genes *CYP79B3* y *BCAT4* respecto a *PP2A*. Análisis de la expresión de ambos genes mediante RT-qPCR en las líneas Col-0, *gi-2*, *jaz3-1*, *jaz10-1*, *jaz3-1;gi-2* y *jaz10-1;gi-2*. Se muestra la media \pm SEM (n=3). Test de comparación múltiple Tukey ($p < 0,05$).

Será sin embargo necesario repetir los análisis de expresión utilizando mutantes de mayor orden, tales como *jaz3-1;jaz10-1;gi-2* y *jaz5-1;jaz10-1;gi-2*, que permitirán observar un efecto más significativo sobre el alivio de la represión de las mutaciones de *jaz* en *gi-2*.

3.4 Ensayo de transactivación.

Con el fin de indagar en el mecanismo molecular por el cual GI reprime a los JAZ, se realizó un ensayo de transactivación. El objetivo de este ensayo era comprobar la hipótesis de que GI, al interactuar con los JAZ, evita su actividad represora sobre MYC2.

Para este ensayo, se clonó el promotor del gen diana de MYC2 *BCAT4* (pBCAT4) en la construcción pGreenII 0800-Luc, de manera que pBCAT4 dirige la expresión del gen de la luciferasa. Dicha construcción se infiltró en hojas de *Nicotiana bethamiana* junto con distintas combinaciones de efectores: GFP como control negativo, MYC2 como efector promotor de la expresión a partir de pBCAT4::LUC, MYC2+JAZ3, que nos permite medir la actividad represora de JAZ3 sobre MYC2, MYC2+JAZ3+GI, combinación de interés, y MYC2+JAZ3+GFP como control de nuestra combinación de interés.

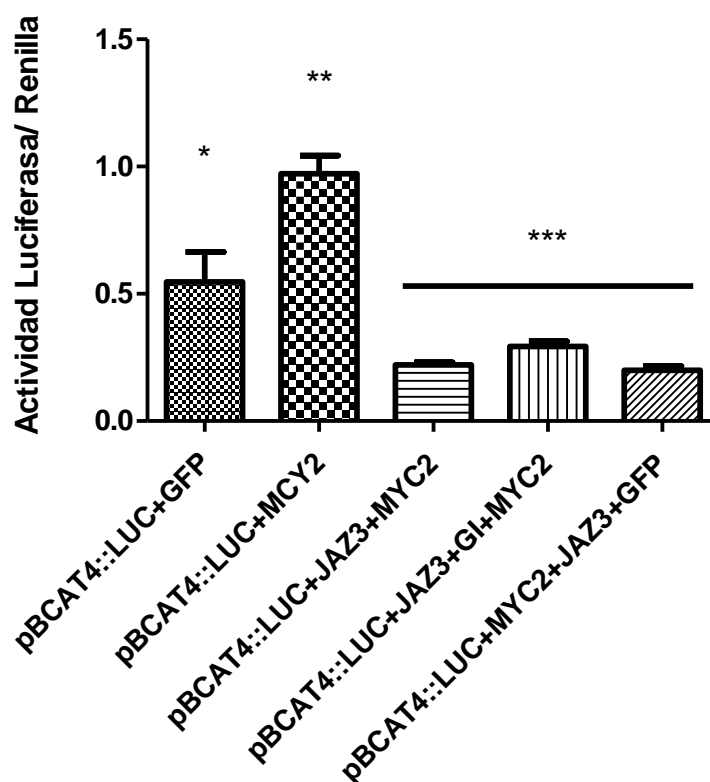


Figura 17: Actividad relativa Luciferasa/Renilla. Media \pm SEM (n=4) para cada una de las combinaciones: pBCAT4:LUC+GFP, pBCAT4:LUC+GFP+MYC2, pBCAT4:LUC+MYC2+JAZ3, pBCAT4:LUC+MYC2+JAZ3+GI y pBCAT4:LUC+GFP+MYC2+JAZ3. Test de comparación múltiple Tukey (ANOVA) ($p < 0.05$, * indican grupos estadísticos).

Como se observa en la figura 17, y tal como se esperaba, la introducción de JAZ3 suprime la actividad activadora de MYC2. A su vez, cuando GI está presente parece incrementarse ligeramente la expresión relativa de la luciferasa, poniéndose de manifiesto la actividad represora de GI sobre JAZ3. Sin embargo,

a nivel estadístico, no existen diferencias significativas entre las dos condiciones cuando analizamos los resultados con una ANOVA. En cambio, cuando realizamos un test de Student entre los grupos pBCAT4:LUC+JAZ3+MYC2+GI y pBCAT4:LUC+JAZ3+MYC2 obtenemos que ambos grupos son estadísticamente diferentes. Si bien la gran varianza existente entre grupos hace necesaria la repetición del experimento, los datos obtenidos sugieren que GI efectivamente podría tener un papel en la regulación de la actividad de JAZ3. En un futuro se pretende analizar el papel de GI sobre la actividad de otros JAZs.

3.5 Ensayo de la estabilidad proteica en *N. benthamiana*.

El conjunto de resultados obtenidos hasta el momento indica que GI interactúa con los JAZ y ejerce un papel represor sobre ellos. Con el fin de investigar el mecanismo por el cual GI reprime a los JAZs, se realizó un ensayo de estabilidad proteica en expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

Como primer ensayo, se utilizó JAZ3 para analizar la estabilidad, ya que se había observado que GI afectaba a su actividad en el ensayo de transactivación. Por ello, realizamos este ensayo, en el cual se infiltraron 3 combinaciones en hojas de *N. benthamiana*: JAZ3+GFP, JAZ3+GI+GFP y JAZ3+GI+GFP tratado con el inhibidor del proteosoma MG-132. Tres días post-infiltración se extrajeron las proteínas y se determinó su acumulación por Western blot (Figura 18A). Los niveles de JAZ3 (38kDa+etiqueta HA) y GFP (23kDa+etiqueta HA) se cuantificaron con el software Image J, calculándose la cantidad relativa de JAZ3 respecto a GFP en cada una de las muestras. Como se observa en la figura 18B, la coexpresión de GI con JAZ3 no parece promover la degradación de este último, no existiendo diferencias significativas cuando comparamos las combinaciones JAZ3+GI y JAZ3.

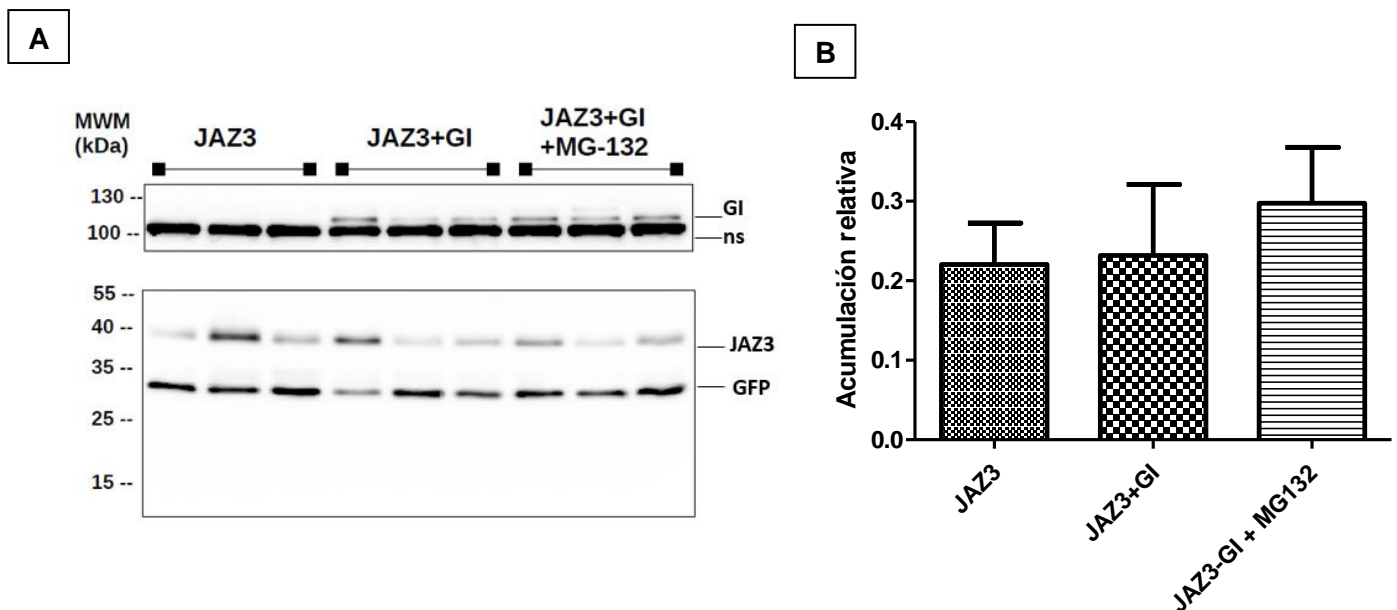


Figura 18: Ensayo de estabilidad proteica de JAZ3. A) Western blot de las muestras biológicas. ns, no específico. B) Acumulación relativa JAZ3/GFP utilizando para la cuantificación el software Image J. Media (n=3) ± SEM. Test de comparación múltiple Tukey (p<0.05).

A continuación, se analizó el efecto de GI sobre la acumulación de otros JAZ, en concreto JAZ9 y JAZ10. En el caso del ensayo con JAZ10 (Figura 19A), observamos que hay una mayor acumulación de JAZ10 cuando co-expresamos GI, aunque el análisis estadístico con ANOVA no muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Figura 19B).

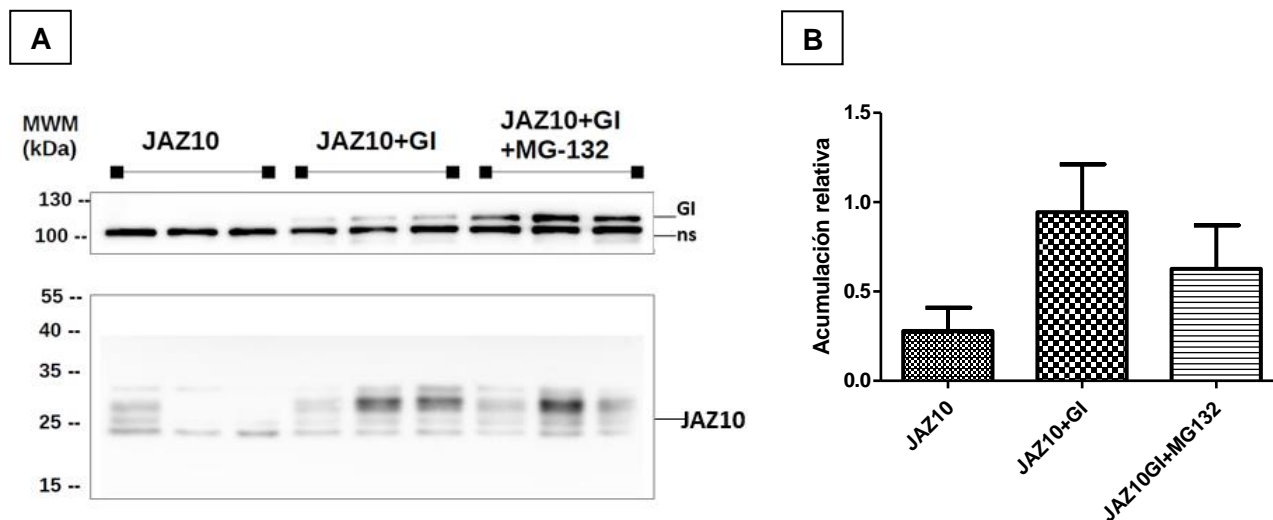


Figura 19: Ensayo de estabilidad proteica de JAZ10. A) Western blot de las muestras biológicas. ns, no específico. B) Acumulación relativa de JAZ10 utilizando para la cuantificación el software ImageJ. Media (n=3) ± SEM. Test de comparación múltiple Tukey (p<0.05).

Para el caso de JAZ9 (Figura 20A), los resultados obtenidos fueron más claros y pusieron de manifiesto que la presencia de GI estabiliza significativamente a JAZ9 (Figura 20B). La interacción entre GI y JAZ9, por tanto, no parece promover la degradación de este último, sino que lo estabiliza, probablemente al impedir el acceso de proteínas implicadas en su degradación.

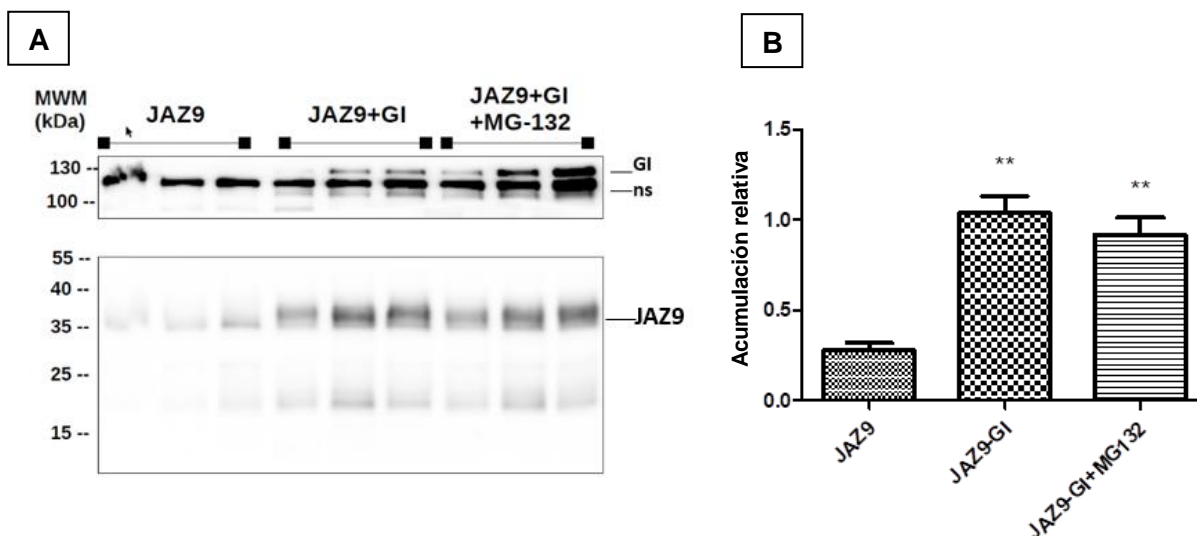


Figura 20: Ensayo de estabilidad proteica de JAZ9. A) Western blot de las muestras biológicas. ns, no específico. B) Acumulación relativa JAZ9 utilizando para la cuantificación el software ImageJ. Media (n=3) ± SEM. Test de comparación múltiple Tukey (p<0.05). (** Indican diferencias estadísticamente significativas entre JAZ9 y los otros dos grupos)

Por tanto, las evidencias obtenidas sugieren que la acción represora que GI ejerce sobre los JAZs ocurriría de manera más probable a través de un mecanismo de secuestro, que impediría la interacción entre JAZ y MYC2.

Además, estamos seleccionando varias líneas transgénicas de *A thaliana* que expresan JAZ3, JAZ5, JAZ9 y JAZ10 etiquetados con el epítipo HA y cuya expresión está dirigida por fragmentos promotores endógenos. Estas líneas se cruzarán con mutantes de pérdida o ganancia de función de *GI* para analizar el efecto de GI sobre su acumulación y actividad *in vivo*.

4. CONCLUSIÓN

En este trabajo hemos estudiado el papel de GIGANTEA en la ruta de señalización del ácido jasmónico mediante su interacción con las proteínas JAZs, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- GI interactúa con JAZ3, JAZ5, JAZ9 y JAZ10 *in vitro* en levadura y en un ensayo de co-inmunoprecipitación *in vitro*, en el que también se observó interacción con MYC2.
- La mutación de *GI* es epistática a la mutación de los *JAZ* en ausencia de JA, mientras que la mutación de los JAZs es epistática a la mutación de *GI* en presencia de altas concentraciones de JA.
- En el mutante *gi-2*, los genes de respuesta a JA se encuentran reprimidos, especialmente a ZT0.
- La mutación de *GI* reduce los niveles de expresión de los genes inducidos por MYC2, pero estos pueden recuperarse al mutar a los JAZ.
- Utilizando un ensayo de transactivación, se ha comprobado que *GI* modula negativamente la actividad de JAZ3.
- Analizando la estabilidad proteica en ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*, se ha observado que *GI* no promueve la degradación de los JAZ, siendo por tanto probable que *GI* regula la actividad de los JAZs a través de un mecanismo de secuestro.

Con estos datos, proponemos que GIGANTEA regula la actividad de los JAZs durante la noche permitiendo una correcta respuesta de la ruta del ácido jasmónico durante la mañana, añadiendo un nivel de regulación extra del reloj sobre la defensa.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.

Las líneas utilizadas en este trabajo fueron *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) y *gi-2* (Fowler et al., 1999). Las demás líneas de mutantes se obtuvieron del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC): *jaz3-1* (SALK_139337), *jaz9-1* (SALK_004872), *jaz10-1* (SAIL_92_D08), *jaz5-1;jaz10-1* (N2107792) y *jaz3-1;jaz10-1* (N2107791).

A partir de las anteriores líneas, se generaron mediante cruces los siguientes dobles mutantes: *gi-2;jaz3-1*, *gi-2;jaz9-1*, *gi-2;jaz10-1*. Y los siguientes triples mutantes: *gi-2;jaz3-1*(heterocigota);*jaz10-1*, *gi-2;jaz3-1;jaz10-1*(heterocigota) y *gi-2;jaz5-1*(heterocigota);*jaz10-1*.

5.2 Genotipado de las líneas.

Para la identificación de las líneas mutantes homocigotas, se utilizó el método de extracción de DNA descrito por Edwards y colaboradores (Edwards et al., 1991), tomando una hoja por planta de *Arabidopsis*, permitiendo una extracción sencilla y de alto rendimiento. Los cebadores utilizados para determinar la presencia de los T-DNA mediante PCR se muestran en la tabla 3.

Secuencia	Propósito
GTGTGAAAGGCACCGTATTGTTGC	<i>Gl</i> transgen, genotipado, directo
GTTATGGCACAACTGATTGCTG	<i>Gl</i> trasngen, genotipado, reverso
GCTAACATGTTCACTATCCTAACAG	<i>gi-2</i> , genotipado, directo
GTCGGAGAACCACTAGTTGTAGC	<i>gi-2</i> , genotipado, reverso
ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	SALK cebador común para LBb1.3
TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCG	SAIL cebador común
ATGGGCTACAACACAAAATGG	<i>JAZ3</i> , genotipado, directo
GTGCCTCTGTGCGATTCTTCAG	<i>JAZ3</i> , genotipado, reverso
ACGTTCCACGATCTGATTTTG	<i>JAZ5</i> , genotipado, directo
GTACTCTTCCATTTTACGCGC	<i>JAZ5</i> , genotipado, reverso
TCATGCTCATTGCATTAGTCG	<i>JAZ9</i> , genotipado, directo
AGGGTTAAGTACGAAGGCAGC	<i>JAZ9</i> , genotipado, reverso
CTTCTCGAGAAAACGTTGCAG	<i>JAZ10</i> , genotipado, directo
TCACATGAGAAATCAGAATCCG	<i>JAZ10</i> , genotipado, reverso

Tabla 3. Listado de cebadores para el genotipado.

Todas las semillas se lavaron con una solución de etanol (70%) + Triton X-100 (0.1%) durante un período de 5-10 minutos en agitación, a lo que siguió un lavado de 2-5 min con una solución de etanol (96%). Posteriormente, se retiró el etanol 96 % y las semillas se dejaron secar para eliminar los restos de etanol. Las semillas estériles se plaquearon directamente o se dejaron en agua estéril a 4°C por un período de 2 a 3 días para estratificarlas.

5.3 Construcción de los vectores binarios

Los vectores utilizados para la co-inmunoprecipitación *in vitro*, los ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* y de doble híbrido fueron generados mediante la tecnología Gateway (Invitrogen). Los cDNAs de los genes *JAZ3*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10* y *MYC2* fueron amplificados con y sin codón de parada mediante PCR; los cebadores empleados se muestran en la tabla 4. Los cDNAs amplificados fueron clonados en el vector pDONR207 mediante la reacción de recombinación BP de Gateway. Posteriormente, se realizó la reacción de recombinación LR Gateway, transfiriendo los cDNAs a los vectores de destino correspondientes. Para el ensayo de doble híbrido en levadura el cDNA de *Gl* se transfirió al plásmido pGBKT7, mientras que *JAZ3*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10* y *MYC2* se clonaron en el plásmido pGADT7. En el caso del ensayo de co-inmunoprecipitación *in vitro*, se transfirieron los cDNAs al plásmido pTNT con la etiqueta HA, exceptuando *Gl* que se transfirió al plásmido pTNT con la etiqueta FLAG.

Para los ensayos de *N. benthamiana* se utilizó el plásmido pEG201, transfiriendo todos los cDNA este plásmido, excepto *Gl*, que se transfirió al plásmido pEG202. Para los ensayos de transactivación, la región promotora de *BCAT4* se amplificó mediante PCR, desde el fin del gen anterior hasta el ATG. Esta secuencia se clonó en el vector pGreenII 0800-LUC utilizándose las enzimas de restricción XhoI y BamHI.

Secuencia	Propósito
TATGGAGAGAGATTTTCTCG	JAZ3 (fwr) en pDONR
TTAGGTTGCAGAGCTGAG	JAZ3+STOP (rev) en pDONR
TATGTCGTCGAGCAATG	JAZ5 (fwr) en pDONR
TATAGCCTTAGATCG	JAZ5+STOP (rev) en pDONR
TATGGAAAGAGATTTTCTG	JAZ9 (fwr) en pDONR
TTATGTAGGAGAAGTAG	JAZ9+STOP (rev) en pDONR
TATGTCGAAAGCTACCATAG	JAZ10 (fwr) en pDONR
TTAGGCCGATGTCGGATAG	JAZ10+STOP (rev) en pDONR
TATGACTGATTACCGGCTAC	MYC2 (fwr) en pDONR
TTAACCGATTTTTGAA	MYC2+STOP (rev) en pDONR
GGCGCGGCCTCGAGGTGACTCAAGTTCAA TA	pBCAT4 (fwd) en pGLUC
GGCGCGCGGATCCGGATGTGTTTGTTCG AG	pBCAT4 (rev) en pGLUC

Tabla 4. Listado de cebadores utilizados para la construcción de los vectores binarios.

5.4 Extracción de RNA y RT-qPCR

La extracción de RNA se realizó con el kit Nucleospin RNA plant (Macherey-Nagel). Para la retrotranscripción (RT) se utilizó un 1 µg de RNA total, pretratado con DNAsal, y se empleó el kit NZY *first strand cDNA*. El cDNA fue amplificado mediante PCR cuantitativa a tiempo real con Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Takara Bio) en el equipo QuandStudio 3 (Thermo Fisher).

Como control interno se utilizó el gen *PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A)*. Las secuencias de los cebadores necesarios se encuentran en la tabla 5.

Secuencia	Propósito
TAACGTGGCCAAAATGATGC	<i>PP2A</i> , qPCR, directo
GTTCTCCACAACCGCTTGGT	<i>PP2A</i> , qPCR, reverso
CTGTA CTGGCACTGCTTCCA	<i>BCAT4</i> , qPCR, directo
ATAGCTTCGCAGCCAATGTT	<i>BCAT4</i> , qPCR, reverso
CTTTGCTTACCGCTGATGAA	<i>CYP79B3</i> , qPCR, directo
GCGTTTGATGGGTTGTCTG	<i>CYP79B3</i> , qPCR, reverso
AATGAGCCTGTTATCAATGC	<i>LOX2</i> , qPCR, directo
CATACTTAACAACACCAGCTCC	<i>LOX2</i> , qPCR, reverso

Tabla 5. Listado de cebadores utilizados para las RT-qPCR.

5.5 Expresión transitoria en *N. benthamiana*

Todas las construcciones fueron transformadas en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (resistente a rifampicina y gentamicina), excepto aquellas construidas a partir del vector pGreenII 0800-LUC, que fueron transformadas en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 con el vector ayudante pSOUP (resistencia a tetraciclina). Los cultivos de *A. tumefaciens* con las respectivas construcciones y con el supresor del silenciamiento p19 se dejaron crecer durante la noche el día anterior a la infiltración en LB con sus respectivos antibióticos. Los cultivos fueron centrifugados y resuspendidos en tampón de agroinfiltración (10 mM MES-KOH pH 5.6, 10 mM MgCl₂, 150 µM de acetosiringona) hasta conseguir un OD₆₀₀ de 0.5. Los cultivos se incubaron durante 2 horas y posteriormente se mezclaron e infiltraron en hojas de *N. benthamiana* a un OD₆₀₀ de 0.1.

Las plantas que fueron tratadas con MG-132 para los análisis de estabilidad se infiltraron 8 horas antes de la recogida de muestras con 25 µM MG-132, inhibidor de la actividad del proteosoma. Las muestras fueron tomadas dependiendo del experimento: 2 días post-inoculación (dpi) para los ensayos de transactivación y 3 dpi para los análisis de estabilidad de las proteínas.

5.6 Ensayo de doble híbrido

Para el análisis de doble híbrido (Y2H) se utilizó el protocolo de co-transformación “Lazybones” con la cepa de *Sacharomices Cerevicae* AH109. El protocolo de transformación utiliza 2µg de cada uno de los plásmidos de interés además de 5µL de 1% ssDNA, llevando el volumen hasta los 50µL con agua mili-Q. Para cada transformación se añadieron 0.5 mL de la solución PLATE (40% PEG 4000, 100 mM Acetato de Litio, 10 mM Tris (7.5 pH) y 0.4 mM EDTA) y levadura, preferiblemente tras no más de 48 horas de crecimiento y una cantidad relativa al anillo de un asa de siembra.

Cada una de las transformaciones se dejaron durante la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se incubaron durante 15 minutos a 42°C, procediéndose a recuperar las levaduras transformadas mediante centrifugación.

Las levaduras co-transformadas se cultivaron en medio de selección (SD/-Leu/-Trp) durante 3 días, utilizándose como control negativo el plásmido pGADT7 vacío. De cada co-transformación se eligieron 3 colonias independientes, que se disolvieron en 100 µL de agua y se gotearon de nuevo en una placa con medio de selección (SD/-Leu/-Trp) durante 2 días. A continuación, se volvieron a gotear en 4 medios diferentes de selección en ausencia de His (SD/-Leu/-Trp/-His) con diferentes concentraciones de 3-Amino-1,2,3,4-triazol, (0 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM) para analizar la interacción.

5.7 Análisis de la acumulación y estabilidad proteica

Cada muestra se homogenizó en 3 volúmenes de tampón de carga 2x SDS-PAGE (0.6% Tris, 2.88% Glicina, 2% SDS) calentando a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se clarificaron por centrifugación a 13 krpm a temperatura ambiente durante 15 min. Las muestras fueron analizadas mediante Western blot y se cuantificaron con el software de imagen NIH ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). La cuantificación de las bandas se normalizó utilizando GFP-HA, para la cuantificación JAZ3, o una banda inespecífica detectada con el anticuerpo anti-FLAG, para la cuantificación de JAZ9 y JAZ10, como controles internos.

5.8 Ensayo de transactivación.

A los 2 días post-inoculación, se tomaron discos de 0.5 cm de diámetro de hojas de *N. benthamiana* infiltradas y se utilizó el kit Dual-Glo Luciferase Assay (Promega) para determinar la actividad de la luciferasa. Las proteínas se extrajeron en 150 µL de Lysis Buffer 1X, añadiéndose 5 µL de muestra a cada pocillo con una cantidad de 40 µL de luciferina previamente añadida. Previamente a la medición utilizando el equipo GloMax 96 Microplate

Luminometer (Promega), la placa se dejó 10 min en oscuridad. Posteriormente a la medición de la luciferasa, se prosiguió a medir la actividad de renilla como control interno. Para ello, se añadieron 40 μL de Dual-Glo a cada pocillo y se dejó otros 10 minutos antes de medir. Cada pocillo se midió 3 veces durante cada una de las mediciones. Para calcular la actividad relativa se dividió cada replica de Luciferasa con cada replica de Renilla y se realizó una media de los valores obtenidos.

5.9 Co-inmunoprecipitación *in vitro*

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación *in vitro*, los cDNAs de *JAZ3*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10*, *MYC2* y *GI* fueron clonados en el vector pTnT mediante Gateway. Los vectores pTnT nos permiten la transcripción y traducción de estas proteínas de manera sintética, en un sistema libre de células. Todas las construcciones contenían la etiqueta HA en el extremo N-terminal excepto *GI* que tenía la etiqueta FLAG.

Utilizando el sistema de expresión proteico TnT SP6 High-Yield Wheat Germ (Promega), se expresaron de manera individual *JAZ3*, *JAZ5*, *JAZ9*, *JAZ10*, *MYC2* y *GI*, añadiéndose 2 μg de cada uno de los plásmidos en 20 μL de agua y completando con 30 μL del Master Mix. Todas las reacciones se incubaron 3 horas a 25°C.

De cada reacción se guardó el 10% (5 μL) como Input, para verificar la expresión, utilizándose finalmente sólo el 5% para el análisis por Western blot. Para la inmunoprecipitación, se mezclaron 22.5 μL de *GI* con 22.5 μL de cada una de las demás proteínas. Entonces se siguió el protocolo de inmunoprecipitación descrito en (Pedmale et al., 2016) usando el anticuerpo anti-HA (Promega).

5.10 Medidas fisiológicas (longitud de hipocótilos)

Para analizar la altura de los hipocótilos, se colocaron las semillas espaciadas en placas con medio $\frac{1}{2}$ MS (30 semillas en media placa cuadrada de 120mm \varnothing). En el caso de los tratamientos con JA, se añadió MeJA al medio en una concentración de 50 μM . Las plantas se crecieron en condiciones de día corto durante 7 días, tras lo cual fueron escaneas y, posteriormente, se analizó la longitud utilizando el software de análisis de imagen NIH ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

5.11 Análisis bioinformático y estadístico

Los análisis estadísticos, así como los gráficos de este TFM, fueron realizados con Statgraphic Prism o Excel, exceptuando algunos de los gráficos realizados en el apartado de metanálisis en los resultados. En este apartado se utilizó R

(RCoreTeam, 2021) para filtrar y analizar los datos de RNA-seq y los resultados fueron representados utilizando varios paquetes según el objetivo. Para representar los genes compartidos entre los diferentes sets de DEGs, se utilizaron los paquetes ggVennDiagram (Gao et al., 2021) y VennDiagram (Chen et al., 2011). En el caso del volcano plot, se utilizó el paquete Enhanced Volcano Plot (Blighe et al., 2021). Como uso común se usó el paquete ggplot2 (Wickham, 2016). En el caso de la identificación de las categorías de ontología génica sobrerrepresentadas, se utilizó la aplicación web PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). Para calificar una categoría como significativa se eligió un valor estadístico p-valor $<0,05$ y este se transformó como $-\log_{10}(p)$ para calcular la puntuación de enriquecimiento de cada subset.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Black, M. M., Stockum, C., Dickson, J. M., Putterill, J., & Arcus, V. L. (2011). Expression, purification and characterisation of GIGANTEA: A circadian clock-controlled regulator of photoperiodic flowering in plants. *Protein Expression and Purification*, 76(2), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.11.009>
- Campos, M. L., Yoshida, Y., Major, I. T., De Oliveira Ferreira, D., Weraduwage, S. M., Froehlich, J. E., Johnson, B. F., Kramer, D. M., Jander, G., Sharkey, T. D., & Howe, G. A. (2016). Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12570>
- Chini, A., Gimenez-Ibanez, S., Goossens, A., & Solano, R. (2016). Redundancy and specificity in jasmonate signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 33(i), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.005>
- Edwards, Johnstone, & Thompson. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, Vol. 19, No. 6, 4(6), 2760–2763. <https://doi.org/10.13031/aim.20141900217>
- Fankhauser, C., & Staiger, D. (2002). Photoreceptors in Arabidopsis thaliana: Light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta*, 216(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0831-4>
- Farinas, B., & Mas, P. (2011). Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation. *Plant Journal*, 66(2), 318–329. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04484.x>
- Fonseca, S., Chico, J. M., & Solano, R. (2009). The jasmonate pathway: the ligand, the receptor and the core signalling module. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.013>
- Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G., & Putterill, J. (1999). GIGANTEA: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO Journal*, 18(17), 4679–4688. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.17.4679>
- Gao, C. H., Yu, G., & Cai, P. (2021). ggVennDiagram: An Intuitive, Easy-to-Use, and Highly Customizable R Package to Generate Venn Diagram. *Frontiers in Genetics*, 12(September). <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.706907>
- Goodspeed, D., Chehab, E. W., Min-Venditti, A., Braam, J., & Covington, M. F. (2012). Arabidopsis synchronizes jasmonate-mediated defense with insect circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4674–4677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116368109>
- Greenham, K., & McClung, C. R. (2015). Integrating circadian dynamics with

- physiological processes in plants. *Nature Reviews Genetics*, 16(10), 598–610. <https://doi.org/10.1038/nrg3976>
- Hsu, P. Y., & Harmer, S. L. (2014). Wheels within wheels: The plant circadian system. *Trends in Plant Science*, 19(4), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.007>
- Huot, B., Yao, J., Montgomery, B. L., & He, S. Y. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: A balancing act to optimize fitness. *Molecular Plant*, 7(8), 1267–1287. <https://doi.org/10.1093/mp/ssu049>
- Ingle, R. A., Stoker, C., Stone, W., Adams, N., Smith, R., Grant, M., Carré, I., Roden, L. C., & Denby, K. J. (2015). Jasmonate signalling drives time-of-day differences in susceptibility of Arabidopsis to the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, 84(5), 937–948. <https://doi.org/10.1111/tpj.13050>
- James, A. B., Syed, N. H., Bordage, S., Marshall, J., Nimmo, G. A., Jenkins, G. I., Herzyk, P., Brown, J. W. S., & Nimmo, H. G. (2012). Alternative splicing mediates responses of the Arabidopsis circadian clock to temperature changes. *Plant Cell*, 24(3), 961–981. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093948>
- Kim, W. Y., Ali, Z., Park, H. J., Park, S. J., Cha, J. Y., Perez-Hormaeche, J., Quintero, F. J., Shin, G., Kim, M. R., Qiang, Z., Ning, L., Park, H. C., Lee, S. Y., Bressan, R. A., Pardo, J. M., Bohnert, H. J., & Yun, D. J. (2013). Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in Arabidopsis. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2357>
- McWatters, H. G., & Eriksson, M. E. (2016). Plant Circadian Rhythms. *ELS*, 18(April), 1–10. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020113.pub2>
- Millar, A. J. (2016). The Intracellular Dynamics of Circadian Clocks Reach for the Light of Ecology and Evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 595–618. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115619>
- Naur, P., Hansen, C. H., Bak, S., Hansen, B. G., Jensen, N. B., Nielsen, H. L., & Halkier, B. A. (2003). CYP79B1 from *Sinapis alba* converts tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409(1), 235–241. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00567-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00567-2)
- Nohales, M. A., & Kay, S. A. (2016). Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(12), 1061–1069. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3327>
- Nohales, M. A., Liu, W., Duffy, T., Nozue, K., Sawa, M., Pruneda-Paz, J. L., Maloof, J. N., Jacobsen, S. E., & Kay, S. A. (2019). Multi-level Modulation of Light Signaling by GIGANTEA Regulates Both the Output and Pace of the Circadian Clock. *Developmental Cell*, 49(6), 840-851.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.030>
- Pauwels, L., & Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: A crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell*, 23(9), 3089–3100. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089300>

- Pauwels, L., Morreel, K., De Witte, E., Lammertyn, F., Van Montagu, M., Boerjan, W., Inzé, D., & Goossens, A. (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured Arabidopsis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(4), 1380–1385. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711203105>
- Pedmale, U. V., Huang, S. S. C., Zander, M., Cole, B. J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P. A. B., Sridevi, P., Nito, K., Nery, J. R., Ecker, J. R., & Chory, J. (2016). Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell*, *164*(1–2), 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.018>
- Perales, M., & Más, P. (2007). A functional link between rhythmic changes in chromatin structure and the Arabidopsis biological clock. *Plant Cell*, *19*(7), 2111–2123. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050807>
- Pruneda-Paz, J. L., Breton, G., Nagel, D. H., Kang, S. E., Bonaldi, K., Doherty, C. J., Ravelo, S., Galli, M., Ecker, J. R., & Kay, S. A. (2014). A Genome-Scale Resource for the Functional Characterization of Arabidopsis Transcription Factors. *Cell Reports*, *8*(2), 622–632. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.033>
- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C., & Conti, L. (2013). GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR of OVEREXPRESSION of CONSTANS1[c][w]. *Plant Physiology*, *162*(3), 1706–1719. <https://doi.org/10.1104/pp.113.217729>
- Romera-Branchat, M., Andrés, F., & Coupland, G. (2014). Flowering responses to seasonal cues: What's new? *Current Opinion in Plant Biology*, *21*, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.006>
- Sauerbrunn, N., & Schlaich, N. L. (2004). PCC1: A merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. *Planta*, *218*(4), 552–561. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1143-z>
- Schuster, J., Knill, T., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Binder, S. (2006). BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Cell*, *18*(10), 2664–2679. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039339>
- Schweizer, F., Fernández-Calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., Lewsey, M. G., Ecker, J. R., Solano, R., & Reymond, P. (2013). Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factors MYC2, MYC3, and MYC4 regulate glucosinolate biosynthesis, insect performance, and feeding behavior. *Plant Cell*, *25*(8), 3117–3132. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115139>
- Song, Y. H., Shim, J. S., Kinmonth-Schultz, H. A., & Imaizumi, T. (2015). Photoperiodic flowering: Time measurement mechanisms in leaves. *Annual Review of Plant Biology*, *66*(December 2014), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115555>

- Staswick, P. E. (2008). JAZing up jasmonate signaling. *Trends in Plant Science*, 13(2), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.11.011>
- Thireault, C., Shyu, C., Yoshida, Y., St. Aubin, B., Campos, M. L., & Howe, G. A. (2015). Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 82(4), 669–679. <https://doi.org/10.1111/tpj.12841>
- van Moerkercke, A., Duncan, O., Zander, M., Simura, J., Broda, M., Bossche, R. Vanden, Lewsey, M. G., Lama, S., Singh, K. B., Ljung, K., Ecker, J. R., Goossens, A., Millar, A. H., & van Aken, O. (2019). A MYC2/MYC3/MYC4-dependent transcription factor network regulates water spray-responsive gene expression and jasmonate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(46), 23345–23356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911758116>
- Yang, D. L., Yao, J., Mei, C. S., Tong, X. H., Zeng, L. J., Li, Q., Xiao, L. T., Sun, T. P., Li, J., Deng, X. W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z., & He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1201616109>
- Zheng, X. Y., Zhou, M., Yoo, H., Pruneda-Paz, J. L., Spivey, N. W., Kay, S. A., & Dong, X. (2015). Spatial and temporal regulation of biosynthesis of the plant immune signal salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(30), 9166–9173. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511182112>
- Züst, T., & Agrawal, A. A. (2017). Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 68(January), 513–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040856>
- Chen, H., Boutros, P.C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* 12, 35 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-35>
- Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>