



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales

“Estudio de la regulación del reloj
circadiano de *Arabidopsis thaliana* por
señales ambientales”

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

de Leone María José

Director de tesis: Dr. Marcelo J. Yanovsky

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Cerdán

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir/ IIBBA-CONICET

Fecha de defensa: 13 de marzo de 2019

ÍNDICE

Agradecimientos

Resumen

Introducción	1
El reloj biológico	1
Características del reloj biológico	1
Red regulatoria	2
Niveles de regulación del reloj circadiano	5
Exportación nuclear de mensajeros	6
<i>Inputs</i> del reloj	8
<i>Outputs</i> del reloj	11
La respuesta inmune en plantas	16
Barreras físicas	16
Inmunidad gatillada por patrones microbianos	16
Inmunidad gatillada por efectores	20
Resistencia sistémica adquirida	20
Regulación circadiana del sistema inmune	21
Efecto del estrés biótico sobre el reloj circadiano	24
Objetivos	26
Materiales y Métodos	27
Material vegetal	27
Condiciones de crecimiento	27
Genotipado de mutantes	27
Ensayos de movimiento de hojas	28
Ensayos de elongación de hipocotilos	29
Ensayos de tiempo de floración	29
Ensayos de bioluminiscencia	29
Re-secuenciación del genoma completo de Col-0 y <i>eds4</i>	30
SHOREmapping	31
Validación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs)	31
Evaluación de la letalidad embrionaria	31
Ensayo de resistencia a la infección bacteriana	31
Análisis de la regulación circadiana del complejo del poro nuclear	32

Condiciones de crecimiento y protocolo empleado para la preparación de librerías de ADNc y secuenciación masiva ...	33
Procesamiento de las lecturas de RNA-seq	34
Análisis de expresión diferencial	35
Distribución diferencial de transcriptos	35
Análisis de categorías funcionales enriquecidas	35
Medición por RT-PCR de la expresión de genes <i>lhpi</i>	36
Análisis de la morfología de hoja y biomasa	37
Caracterización de la respuesta fototrópica	37
Accesiones utilizadas	38
Resultados	39
Identificación de candidatos a mediar la relación reloj-defensas	39
Caracterización fisiológica de la mutante <i>enhanced disease susceptibility 4 (eds4)</i>	41
Mapeo de la mutación responsable del fenotipo <i>enhanced disease susceptibility 4 (eds4)</i>	44
Regulación circadiana del complejo del poro nuclear	49
Caracterización transcripcional de <i>eds4</i>	51
Análisis del efecto del estrés biótico sobre el reloj circadiano	54
Estudio del rol de la familia génica NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (LNK) en la relación reloj-defensa	56
Caracterización circadiana de la familia génica <i>LNK</i>	57
Análisis del rol de la familia LNK en otros procesos del desarrollo vegetal	60
Discusión	64
<i>Enhanced Disease Susceptibility 4 (eds4)</i> como candidato novedoso a mediar la relación reloj-defensas	64
Develando el misterio de <i>eds4</i>	65
El complejo del núcleo-poro y su rol en las funciones circadianas y de defensa	66
Efectos de la infección por patógenos sobre el reloj circadiano	69
La familia génica LNK y los mecanismos de defensa	73
Caracterización fisiológica de la cuádruple mutante <i>lnkQ</i> ..	73
¿Crecer o defenderse? He ahí la cuestión	76
Comentarios finales	78

Bibliografía.....	80
Figuras suplementarias.....	91

Información suplementaria digital:

- **Información suplementaria 1.** Genes diferencialmente expresados (GDE) en la mutante *eds4* en contraste con plantas salvajes Col-0.
- **Información suplementaria 2.** Análisis de las ontologías génicas de los genes diferencialmente expresados en *eds4*.
- **Información suplementaria 3.** Análisis de las ontologías génicas de los transcritos diferencialmente distribuidos (TTD) en *eds4*.
- **Información suplementaria 4.** Genes diferencialmente expresados en plantas salvajes Col-0 tratadas con la cepa virulenta *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 en contraste con tratamiento control (MgSO₄ 10mM) a 1 hora post-infección (GDE 1 h.p.i).

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y a la Universidad de Buenos Aires porque hoy y siempre estaré agradecida de "haber caído" en la pública.

A la Fundación Instituto Leloir, institución a la cual me enorgullece pertenecer.

A Marce por abrirme las puertas hacia al mundo de la ciencia, transmitirme su pasión por lo que hacemos y permitirme trabajar de lo que amo.

A Santi Mora por toda la ayuda y estar siempre dispuesto a compartir conmigo su vasto conocimiento.

A todo el labo Casal (del ahora y del ayer): Lu, Anto, Ceci, Ger y la otra Majo, gracias por ser lxs mejores vecinxs!

A lxs pequeñxs del labo: Marian, Dani, Lu, Jean, Coni y Anto, gracias por la buena onda y los días de ciencia compartidos.

A toda "la vieja escuela": Juli, Beck, Andrew, Gusti, Stefi, Caro, Sabri, Mati, Sole, Javi, gracias por enseñarme todo lo que se y por los after lab compartidos! Fueron y son lxs mejores compañerxs de laboratorio posible.

A Marti, por ser un gran ejemplo de mujer y científica. Fuiste una gran influencia durante todo mi doctorado y una más aún una gran amiga.

A Nico y Nahui, por las horas de cursadas y más aún por los años de amistad más allá de la facu. Conocerlos fue de lo mejor que me paso en Exactas.

A Maga (nótese que no puse Chicha) por ser todo lo que está bien en esta vida. Compartir la carrera, el doctorado y la vida con vos amiga hace que todo sea más fácil y feliz.

A Mari, Lau e Ine, mujeres bellas y fuertes que me acompañan siempre.

A Jose y Flori, hermanas del alma, gracias por ser tan locas y lindas y estar siempre. La vida es infinitamente mejor con ustedes al lado.

A mis hermanxs, sobrinxs y cuñadxs por creer siempre en mí, muchas veces más de lo que yo misma creo. En especial a mi hermana Maru por ser mi fan número uno y apoyarme siempre en todo. Lxs quiero muchísimo.

A Esteban, el mejor compañero de laboratorio y vida que uno podría desear. Gracias. Te amo infinito.

A mis viejxs. Sin duda sin su apoyo incondicional no estaría donde estoy. Gracias por darme la oportunidad de estudiar y por alentarme a seguir mi pasión siempre. Gracias por inculcarme la fascinación por el saber, la ciencia y la naturaleza, y gracias también por acompañarme en cada paso de este largo recorrido. Esta tesis se las dedico a ellxs.

*"Defiende tu derecho a pensar,
porque incluso pensar de manera
errónea es mejor que no pensar..."*

Hipatia de Alejandría

"Estudio de la regulación del reloj circadiano de *Arabidopsis thaliana* por señales ambientales"

RESUMEN

El reloj circadiano de las plantas regula múltiples procesos biológicos, y en simultáneo muchos de estos procesos afectan la regulación del reloj. Se ha demostrado que el reloj biológico de plantas regula respuestas inmunes; no obstante, poco se sabe sobre el efecto recíproco de la interacción planta-patógeno sobre la función circadiana. En la presente tesis mostramos que una mutante deficiente en la respuesta inmune, *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)*, presenta alteraciones en múltiples funciones asociadas al reloj. Aplicando una estrategia de mapeo por secuenciación pudimos determinar que EDS4 codifica para el ortólogo en *Arabidopsis* de la NUCLEOPORINA 205. Un análisis transcriptómico de *eds4* reveló que muchos genes centrales del reloj presentan una expresión diferencial en la mutante, así como una mayor acumulación de sus mensajeros en el núcleo, lo cual es consistente con un rol del complejo del poro nuclear (NPC) en el control de la función circadiana a través de la modulación del tráfico núcleo/citoplasmático. Simultáneamente, encontramos que una infección con *Pseudomonas syringae* en plantas salvajes altera la expresión de la mayoría de los genes centrales del reloj, incluida la familia génica de activadores NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (LNK), tan solo una hora luego de la infección, encontrándose este efecto atenuado en la mutante *eds4*. Más aún, las mutantes *lnk* se mostraron más susceptibles que plantas silvestres frente a la infección por *Pseudomonas*. Estos resultados refuerzan la idea de una regulación recíproca entre el reloj circadiano y el estrés biótico, sugiriendo que una modulación en la expresión de genes del reloj mediada por cambios en la función del poro nuclear juega un rol importante en la facilitación del proceso infeccioso.

Palabras clave: *Arabidopsis*, reloj circadiano, patógenos, regulación transcripcional, LNKS

"Study of the regulation of *Arabidopsis thaliana* circadian clock by environmental signals"

ABSTRACT

Circadian clocks regulate multiple biological processes in plants and several clock regulated signaling pathways feedback to control clock function. The circadian clock has been shown to modulate plant immunity and the role of several clock genes in the control of biotic stress responses has been addressed, but whether plant-pathogen interactions modulate clock function is still unknown. Here we show that *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)*, a defense mutant, displays alterations in circadian rhythms and clock associated responses. Using a mapping by sequencing approach we determined that *EDS4* encodes the *Arabidopsis* orthologue of NUCLEOPORIN 205. Consistent with a role for the nuclear pore complex (NPC) in the control of clock function, the transcriptome of *eds4* mutants shows a strong enrichment in miss-regulated clock genes and accumulation of clock mRNAs in the mutant nucleus. Simultaneously, we found that an infection with *Pseudomonas syringae* strongly alters the expression of most core clock genes, including the four members of the NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (LNK) gene family, as early as 1h post-infection in wild type (wt) plants, and that this effect was attenuated in *eds4* mutants. Furthermore, *lnk* mutants were more susceptible than the wt to *Pseudomonas syringae* infection. These results reinforce the idea of a strong crosstalk between biotic stress stimulus and the *Arabidopsis* circadian clock. Taken together with previous findings showing that bacterial infection alters the permeability of the nuclear pore, our research strongly suggest that bacterial modulation of clock gene expression mediated in part by changes in NPC function, plays a key role in facilitating the infectious process.

Key words: *Arabidopsis*, circadian clock, pathogens, transcriptional regulation, LNKs.

Introducción

EL RELOJ BIOLÓGICO

Dada la naturaleza sésil de las plantas, no es sorprendente encontrar que estas han desarrollado evolutivamente una gran plasticidad para responder adecuadamente y adaptarse a los continuos cambios ambientales a los que se ven expuestas. En particular, existen variaciones ambientales periódicas, como los ciclos de día y noche o las estaciones del año, a las cuales las plantas no solo son capaces de responder sino también de anticiparse. Para ello, las plantas hacen uso de un mecanismo endógeno de medición del tiempo encargado de integrar las señales externas del ambiente al estado interno del organismo, optimizando así el desarrollo de la planta en sincronía con un siempre cambiante medio ambiente. A este sofisticado sistema de medición del tiempo se lo denomina Reloj Biológico.

Características del reloj biológico

Tal es la relevancia del sistema, que este mecanismo endógeno de medición del tiempo se encuentra presente en todos los dominios de la vida (Bacteria, Archaea and Eukarya)¹ e incluso conserva características comunes en todos ellos. Estas características son la capacidad de entrenamiento por ciclos alternados de luz-oscuridad o calor-frío, una periodicidad auto-sustentada aún en ausencia de estímulos ambientales (condición conocida como "de libre curso") y la compensación ante cambios en la temperatura¹.

Es concordancia, en la mayoría de los seres vivos hasta el momento estudiados se ha identificado una regulación temporal precisa de múltiples procesos fisiológicos, del desarrollo y hasta comportamentales, en sincronía con los cambios geofísicos ambientales. Ejemplos de este fenómeno incluyen los ciclos diarios de vigilia y sueño en animales, las transiciones en el desarrollo de hongos filamentosos, los cambios en la posición de órganos en las plantas, y también procesos que ocurren estacionalmente como la floración, la hibernación y las grandes migraciones en mariposas².

En plantas superiores se ha demostrado que la correcta sincronía de este sistema de medición del tiempo con los ciclos diarios de luz y temperatura del medio ambiente circundante brinda una ventaja adaptativa³.

Los ritmos biológicos controlados por el reloj endógeno poseen un período cercano a 24h, en concordancia con la duración de un día terrestre. Por tal motivo, los mismos son denominados Ritmos Circadianos (del latín *'circa'* ~ alrededor de, *'dies'* ~ un día).

A grandes rasgos un sistema circadiano se encuentra compuesto por tres componentes principales: un oscilador central autosustentable (denominado reloj biológico o circadiano), vías de señalización que integran la función del oscilador con señales exógenas temporales (denominadas *inputs* del reloj) y vías de señalización que son controladas por el reloj mismo (denominados *outputs* del reloj), que a su vez controlan diversos procesos biológicos (**Figura 1a**).

Red regulatoria

En plantas superiores, la sincronización de los ritmos biológicos se encuentra asociada a la oscilación en la expresión de cientos de genes estrictamente regulados por un número reducido de proteínas que en conjunto componen el denominado Oscilador Central del reloj, y que se conectan entre sí a través de circuitos de retro-alimentación transcripcional y traduccional.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* el oscilador central del reloj se encuentra compuesto por un modesto número de genes cuya función en diferentes momentos del día regula la expresión génica y actividad de otros miembros de la red circadiana (**Figura 1b**). Por la mañana dos factores de transcripción redundantes de la familia MYB, CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) and LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) presentan picos en sus niveles de expresión⁴⁻⁷. Como consecuencia, se generan proteínas que reprimen su propia expresión, así como la de una a la otra⁸. En adición CCA1 y LHY también actúan como represoras de la

transcripción de otros genes centrales del reloj, entre los cuales se encuentra TIMING OF CAB2 EXPRESSION 1 (TOC1 también llamado PRR1)⁹⁻¹² que a diferencia de CCA1 y LHY posee un pico de expresión vespertino, y un grupo de genes conformado por EARLY FLOWERYNG 3 (ELF3), ELF4 and LUX ARRHYTMO (LUX), que en su conjunto conforman el complejo nocturno (EC, de su nombre en inglés, EVENING COMPLEX)¹³⁻¹⁸, denominados así por expresarse hacia el final del día. Asimismo, existen otros miembros de la familia génica a la cual TOC1/PRR1 pertenece, denominados PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRR5, PRR7 and PRR9), de expresión matutina que también se encuentran sujetos a la represión transcripcional exhortada por CCA1 y LHY^{8,18-22}.

A medida que transcurre el día los niveles de expresión de CCA1 y LHY disminuyen debido a que son reprimidos por la familia de PRRs^{10,20,22,23}. En parte, este fenómeno es posible gracias a la acción de otros tres factores de transcripción del tipo MYB denominados REVEILLE 8 (RVE8), RVE6 y RVE4, que se expresan a media mañana y activan la expresión de los genes *TOC1* y *PRR5*²³⁻²⁵. Llamativamente, estos activadores promueven también la expresión del EC^{14,24,26,27} que actúa como complejo represor de los PRRs lo cual lleva a que por la noche se libere la represión de CCA1 y LHY, habilitando así el comienzo de un nuevo ciclo.

Recientemente dos nuevos genes, con picos de expresión a media mañana, han sido incorporados a esta compleja red regulatoria: NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED GENE 1 (LNK1) and LNK2. Si bien en un principio estos fueron propuestos como activadores transcripcionales, hasta el momento no se han identificado dominios de unión al DNA conocidos en sus secuencias²⁸. No obstante, LNK1 y LNK2 sí interactúan con otros factores de transcripción del tipo MYB, como CCA1, LHY, RVE4 y RVE8^{29,30} y cumplen un rol como co-activadores de RVE4 y RVE8, necesarios para la inducción de la expresión de PRRs y EC^{23,24}.

La familia génica LNK incluye también otros dos homólogos cercanos denominados LNK3 y LNK4. Mientras que LNK1 y LNK2 codifican para proteínas de 66kDA con un 35% de identidad de

secuencia entre sí, las proteínas LNK3 y LNK4 son más pequeñas (alrededor de 30kDa cada una), con un 60% de identidad de secuencia conservada entre sí y un 30% respecto de LNK1 y LNK2²⁸. Homólogos de la familia LNK pueden ser encontrados en otras plantas terrestres, incluso aquellas no vasculares, no obstante LNK3 y LNK4 parecieran haberse originado en un evento de duplicación reciente dentro de la familia *Brassicaceae*²⁸. LNK1 y LNK2 desempeñan roles fundamentales en el correcto funcionamiento del reloj circadiano, sin embargo la pérdida de función de LNK3 y LNK4, por sí solos, no pareciera generar ningún defecto obvio en el reloj de las plantas^{28,29}.

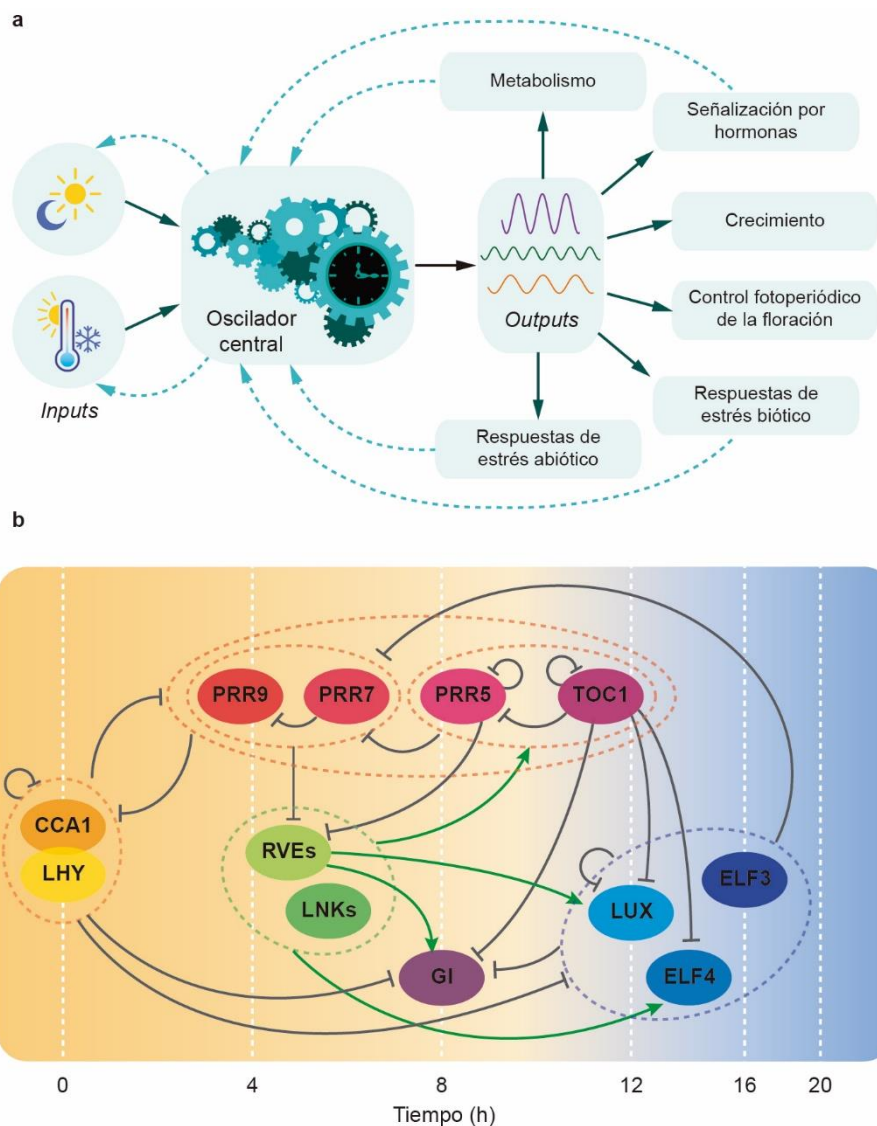


Figura 1. El sistema circadiano en plantas. (a) Señales ambientales como la luz y la temperatura, conocidas como *inputs* del reloj, son interpretadas por proteínas del reloj que componen

el oscilador central. Estas integran las señales ambientales al estado endógeno del sistema vegetal y en consecuencia modulan y coordinan un amplio rango de mecanismos conocidos como *outputs* del reloj. En una visión tradicional se ha considerado esta traducción de señales como a un proceso lineal, no obstante creciente evidencia supone una red mucho más compleja en el cual el reloj regula también su propia sensibilidad a los estímulos ambientales. Sumado a ello, mientras que las vías metabólicas, hormonales y de respuesta a estrés biótico y abiótico presentan una regulación circadiana, intermediarios metabólicos, hormonas y componentes de las vías de señalización de estas presentan también diferentes grados de retro-alimentación hacia el oscilador central, influyendo en la regulación del mismo. **(b)** *Loops* de retroalimentación transcripcional que componen el oscilador central del reloj en *Arabidopsis thaliana*. De izquierda a derecha se representa la expresión secuencial de cada componente a lo largo del día, el pico de actividad se expresa en horas a partir del amanecer. Las áreas naranja y azul representan día y noche, respectivamente. Las líneas negras representan represión y las verdes activación de la transcripción. Los óvalos punteados representan grupos funcionales. Adaptado de Nohales & Kay, 2016³¹

Niveles de regulación del reloj circadiano

El mantenimiento de los ritmos circadianos en los seres vivos depende de la actividad de unas pocas proteínas centrales del reloj. Estas regulan la transcripción de sus propios genes con un período de 24h, así como la transcripción de cientos de genes río abajo, causando la oscilación en los niveles de ARN mensajero (ARNm) para una gran proporción del transcriptoma.

Más allá de esta regulación transcripcional, luego de la transcripción, todo ARNm está sujeto a múltiples procesos que lo llevan a recorrer caminos diversos capaces de afectar el destino funcional de las proteínas resultantes. Esta regulación post-transcripcional de los mensajeros también puede ser controlada por el reloj. Tal es el caso de control circadiano de procesos como el *splicing* alternativo de pre-ARNm, la degradación de ARNm maduros y el control de la traducción³².

Los mensajeros del oscilador central también se encuentran sujetos a esta regulación, siendo el reloj mismo también regulable por procesos post-transcripcionales que condicionan su funcionamiento. Estos procesos además de incluir la regulación del *splicing* alternativo, la degradación y la

traducción, involucran también eventos hasta el momento poco estudiados en plantas, como lo es la exportación de mensajeros del núcleo al citosol.

Exportación nuclear de mensajeros

El núcleo contiene la información genética que dirige la actividad celular, manteniéndola aislada del resto de célula por una bicapa lipídica. Esta característica propia del dominio Eukarya tiene como consecuencia la necesidad de vías de comunicación que permitan el flujo de moléculas dentro y fuera del núcleo. La principal vía de transporte núcleo-citoplasmático de macromoléculas la constituye el denominado complejo del núcleo poro (NPC del inglés, *nuclear pore complex*). El NPC se dispone a través de la membrana nuclear conectando el espacio intra-nuclear con el resto de la célula y, compuesto por más de 30 tipos de proteínas diferentes, conforma el complejo proteico más grande de la célula (**Figura 2**). A los componentes proteicos del NPC se los denomina nucleoporinas (Nups). Si bien mucho se ha estudiado sobre este complejo en vertebrados y levaduras, poco se conoce aún sobre la estructura y funcionamiento del mismo en plantas³³.

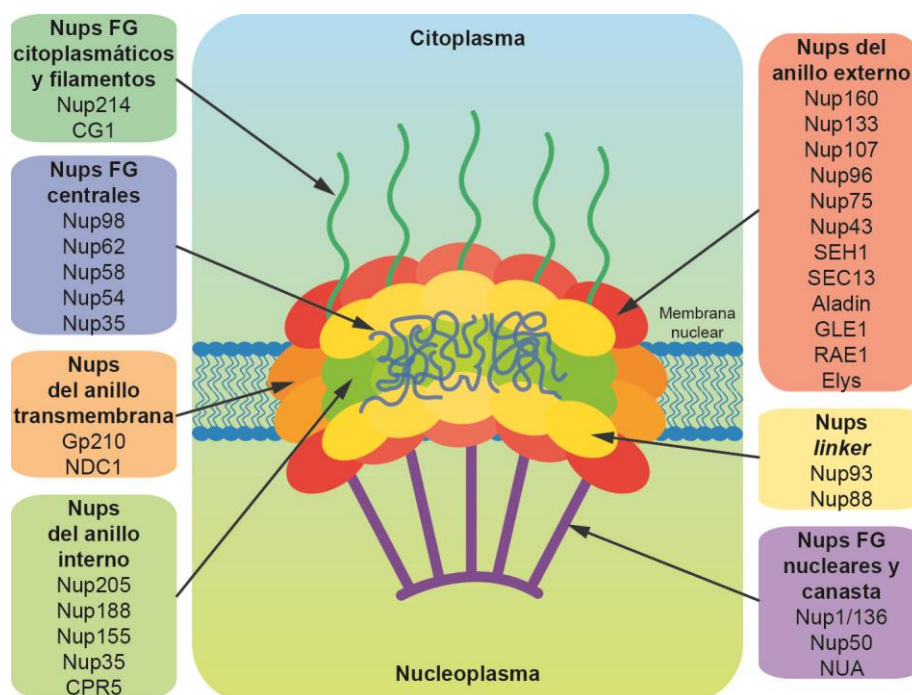


Figura 2. El complejo del poro nuclear (NPC) en plantas. Las nucleoporinas (Nups) se encuentran agrupadas de acuerdo a su ubicación en 7 grupos diferentes. El centro simétrico del complejo se encuentra compuesto por las Nups del anillo externo, las Nups *linker*, las Nups del anillo interno, las Nups del anillo transmembrana y las Nups que contienen repeticiones de fenilalanina y glicina (FG) centrales. Las partes asimétricas del poro están formadas por las Nups FG citoplasmáticas, los filamentos y por las Nups FG nucleares y la canasta nuclear.

Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* con mutantes deficientes en nucleoporinas han demostrado la implicancia de estas en diversas vías de señalización, como por ejemplo, la interacción planta-patógeno³⁴⁻³⁷, las respuestas de estrés biótico^{38,39}, la señalización por hormonas^{40,41} e incluso la función circadiana⁴². En algunos de estos casos pareciera ser que los defectos presentados por las mutantes nulas de Nups son una consecuencia de defectos en la importación de proteínas^{34,35}, pero en la gran mayoría de los estudios se ha detectado también una acumulación exacerbada de ARN mensajeros en los núcleos, principalmente a través de ensayos de hibridación *in situ*^{36,42}.

Tal es caso de la nucleoporina *HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1 (HOS1)*, codificada por un gen inicialmente descrito como involucrado en las respuestas al frío³⁸ y el control del tiempo de la floración⁴³, en cuya mutante nula (*hos1*) se identificó posteriormente un defecto en la función circadiana que resulta en un fenotipo de período largo⁴². Análisis de datos de secuenciación de ARN mostraron que la mutante *hos1* presenta un aumento en la expresión de múltiples genes, entre los cuales se encuentran algunos de los componentes centrales de la maquinaria del reloj como *PRR5*, *TOC1*, *LUX*, *ELF3* y *ELF4*, junto a otros genes de expresión circadiana⁴², lo cual también se ve asociado a una disminución en la ritmicidad y amplitud de los niveles de expresión de varios de los genes del reloj⁴². Es así que estos resultados sugieren que defectos en la exportación de ARN mensajeros podría resultar en defectos en el funcionamiento del reloj, señalando así una relación entre el transporte núcleo-citoplasmático y la regulación circadiana.

Inputs del relojEstímulos lumínicos

A pesar de su naturaleza endógena y autosustentable, el reloj biológico requiere de señales externas para mantenerse correctamente sincronizado con el medio ambiente circundante. A los factores ambientales que proveen dicha información se los denomina *zeitgebers* (del alemán 'zeit' ~ tiempo, 'geber' ~ dador). Dada la naturaleza heterótrofa de las plantas, la luz y, en estrecha relación, la temperatura, han sido dos *zeitgebers* ampliamente estudiados en estos organismos.

La influencia de la luz sobre el funcionamiento del reloj es sumamente relevante y tanto su intensidad como calidad influyen en múltiples niveles de la regulación. La transcripción de los genes del reloj^{4,20,28,44} así como la estabilidad de sus ARN mensajeros⁴⁵, la traducción de los mismos⁴⁵ e incluso la estabilidad de las proteínas codificadas por estos se encuentran regulados por señales lumínicas⁴⁶⁻⁴⁸. Si bien se han identificado los fotoreceptores involucrados en la percepción y/o traducción de señales lumínicas al oscilador central, aún no se conoce en detalle los mecanismos moleculares involucrados en dichos procesos.

Una de las vías de señalización mejor caracterizadas es la que involucra una enzima clave en la degradación proteica denominada ZEITLUPE (ZTL). Esta proteína del tipo F-box, posee un dominio LOV que le otorga la capacidad de percibir la luz en el rango del azul y un dominio KELCH de interacción proteína-proteína. Es así que junto a sus dos homólogos FLAVIN BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX (FKF1) and LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2), ZTL marca a TOC1 y PRR5 para ubiquitinización y subsecuente degradación por proteosoma, regulando de esta manera la periodicidad de la función circadiana^{48,49}. En adición a estos fotoreceptores las plantas poseen también fitocromos (phyA, phyB, phyC, phyD y phyE) que son receptores reversibles de luz roja y roja lejana y criptocromos (cry1 y cry2), otros receptores de la luz azul⁵⁰. Todos estos receptores se encuentran involucrados en el

entrenamiento del reloj y contribuyen al acortamiento de período dependiente de la intensidad lumínica⁵¹. En particular los fitocromos no parecieran ser esenciales para el mantenimiento de oscilaciones robustas, pero sí para la determinación del largo del período⁵¹⁻⁵³. Específicamente, la señalización en el núcleo mediada por el fitocromo B (phyB) es requerida para el mantenimiento de los ritmos en respuesta a la luz roja⁵². El mecanismo principal mediante el cual phyB propaga señales lumínicas a redes transcripcionales suele ser a través de la represión de los factores de transcripción del tipo *basic hélix-loop-helix PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs)*⁵⁴, pero aún un rol para estas proteínas en el control del reloj no ha sido firmemente establecido. No obstante, si se ha identificado la unión directa de phyB a múltiples componentes proteicos del reloj y lo que es más, estas interacciones parecieran estar reguladas también por la presencia o ausencia de luz⁵⁵. Un ejemplo de este tipo de interacción es la unión de este fotorreceptor a uno de los miembros del EC, ELF3. De esta manera phyB media también la interacción de esta proteína del reloj y otros componentes de las vías de señalización por luz⁵⁶. Otro ejemplo de la relación entre fitocromos y componentes del reloj está dado por la regulación de la transcripción de otro componente del EC, ELF4, llevada a cabo por tres reguladores positivos de la vía de señalización del fitocromo A (phyA), ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), FAR RED IMPAIRED RESPONSE (FAR1) y FAR RED ELONGATED HYPOCOTYL (FHY3), quienes se unen de manera directa al promotor de ELF4 y promueven su expresión a medida que el día progresa. Esta unión es luego inhibida al amanecer por la acción de dos proteínas centrales del reloj, CCA1 y LHY, que reprimen así la expresión de ELF4⁵⁷.

Estímulos térmicos

En adición a los ciclos lumínicos, el ciclado de la temperatura también es capaz de regular el entrenamiento del reloj, e incluso algunos genes del oscilador central del reloj se encuentran transcripcionalmente regulados por temperatura^{21,28,58}.

No obstante, a pesar de la capacidad de reseteo y regulación del reloj por parte de los estímulos térmicos, una característica clave del sistema circadiano es la capacidad de mantener un ritmo estable a través de un rango de temperaturas, amortiguando así cambios leves o fisiológicamente irrelevantes en la temperatura del sistema⁵⁸. A este proceso se lo denomina compensación térmica.

En contraposición a nuestra comprensión de los mecanismos de sentido de los estímulos lumínicos, para los cuales conocemos a la mayoría de los receptores, en el caso de estímulos térmicos desconocemos por completo cuales son las moléculas que perciben inicialmente la señal, así como desconocemos mayoritariamente los mecanismos moleculares que transmiten dicha información al reloj central.

Cross-talk entre inputs y outputs del reloj

Cabe destacar que algunos de los componentes de las vías de señalización de estos *inputs* del reloj son a su vez regulados por el reloj mismo. Tal es el caso de la expresión circadiana de fotorreceptores^{57,59} y de algunos factores de transcripción involucrados en las vías de señalización asociadas a altas y bajas temperaturas^{60,61}. Este fenómeno confiere al sistema diferentes niveles de sensibilidad ante los estímulos ambientales externos durante el día y es referido como *gating* circadiano.

Así como en los últimos tiempos se ha demostrado que componentes de las vías de señalización de estos clásicos *inputs*, son en simultáneo *outputs* regulados por el reloj, recientemente se ha identificado que vías que tradicionalmente fueron categorizadas como *outputs* controlados por el sistema circadiano poseen algún grado de retroalimentación hacia el oscilador central, funcionando así también como *inputs* y contribuyendo a su regulación (**Figura 1a**). Tal es el caso de los diversos procesos metabólicos que involucran nutrientes esenciales como el nitrógeno⁶², calcio⁶³, hierro^{64,65}, cobre^{66,67} y carbohidratos⁶⁸, y vías relacionadas a las hormonas de plantas (fitohormonas). Se

ha demostrado que algunas fitohormonas como las citoquininas, las auxinas, los brasinoesteroides y el ácido abscísico poseen la capacidad de modificar al menos algún parámetro del funcionamiento del reloj, indicando la implicancia de estas moléculas en la modulación de la actividad del oscilador central⁶⁹. Esta noción es reforzada por el hecho que múltiples mutantes deficientes en procesos relacionados a estas hormonas presentan cierto grado de alteraciones en sus ritmos circadianos⁶⁹.

Outputs del reloj

Son muchos y muy diversos los procesos que al día de hoy se han identificado como regulados por el reloj biológico. Ensayos de alto rendimiento con microarreglos o secuenciación masiva han demostrado la ubicuidad del control circadiano sobre la expresión génica^{70,71}. De hecho, en análisis de transcriptómica llevados a cabo en plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en diferentes combinaciones de ciclos térmicos y/o lumínicos se ha observado que el 89% de los transcriptos presentan oscilaciones en al menos alguna condición y que la mayoría de los genes presentan un pico de expresión en algún momento del día, el cuál puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales⁷². En condiciones de libre curso, a su vez, se ha observado que el reloj controla aproximadamente la expresión de un tercio del transcriptoma.

A nivel fisiológico, existe un amplio rango de procesos que muestran ritmos circadianos. Estos incluyen movimiento de hojas y pétalos, germinación, actividad enzimática, apertura de estomas, elongación de tallo, sensibilidad a la luz durante la inducción floral y procesos metabólicos como respiración y fotosíntesis, así como respuestas a estrés biótico y abiótico^{4,73-75}. Es así que una precisa regulación circadiana es necesaria para la coordinación de estos múltiples aspectos del desarrollo vegetal. Dos de los procesos que han sido estudiados en mayor profundidad, y que ejemplifican la relevancia de una apropiada sincronía entre los ritmos internos, gobernados por el reloj, y

los estímulos ambientales, son las vías de regulación de la elongación del tallo embrionario (hipocotilo), y del control fotoperiódico de la floración.

Regulación del crecimiento por elongación de tallo embrionario

Al estudiar el proceso de elongación de los hipocotilos en *Arabidopsis* se puede identificar una tasa rítmica de crecimiento, que es sostenida aún en condiciones de libre curso (luz continua). Esta característica, propia de un sistema circadiano, da la pauta de una regulación de este proceso por parte del reloj⁷⁶. No obstante, el crecimiento en oscuridad continuo es arrítmico, lo cual demuestra un requerimiento de la luz para el mantenimiento de la regulación circadiana en la elongación de hipocotilos⁷⁷.

Dos factores de transcripción de la familia génica bHLH (del inglés *basic helix-loop-helix*), denominados PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) and PIF5, son actores claves en el proceso de crecimiento rítmico dependiente de la luz. PIF4 y PIF5 son reguladores positivos del crecimiento y sus niveles de mRNA y proteínas presentan un pico de abundancia hacia el final de la noche, estrechamente relacionado con el momento de mayor expansión celular que promueve la fase de elongación de hipocotilos⁷⁷. La regulación de los niveles y actividad de PIF4 y PIF5 viene dada, durante el día, por el hecho que estas proteínas son marcadas para degradación a través de un vía mediada por la luz, dependiente del fitocromo B (phyB)⁷⁸ y, hacia el comienzo de la noche, por un componente del EC del reloj, ELF3, el cual interactúa con PIF4 inhibiendo su actividad como factor de transcripción⁷⁷. A su vez, la expresión de los genes PIF4 y PIF5 es controlada por el reloj biológico, de modo que sus ARNm sean altos al final de la noche. Este acoplamiento de señales externas fotoperiódicas y una regulación endógena dominada por el reloj circadiano componen un sofisticado mecanismo que gobierna la regulación de la elongación de los hipocotilos⁷⁹.

Control fotoperiódico de la floración

En adición a la regulación de estos procesos que acontecen diariamente, el reloj biológico también controla transiciones periódicas que se dan estacionalmente, siguiendo una suerte de "calendario" biológico⁸⁰, asegurándose así que estas sucedan en las condiciones más favorables del año.

Tal es el caso de una de las transiciones más críticas en la vida de una planta, el pasaje del estado vegetativo al estado reproductivo. La sincronía de este proceso de floración con el medio ambiente es crucial para el éxito reproductivo y en consecuencia evolutivo de una especie vegetal⁸¹.

La señal principal que permite a plantas y animales interpretar el momento del año en el que se encuentran es la del fotoperíodo, es decir la cantidad de horas de luz que posee un ciclo de 24 horas o día terrestre. Como consecuencia de la traslación de la Tierra alrededor del sol, este parámetro varía con el transcurso de las estaciones del año en diferentes sectores del planeta, generándose así el alargamiento o acortamiento de las horas de luz en un día, cuya magnitud depende de la latitud.

En relación a su capacidad de respuestas frente a los cambios en el fotoperíodo, las plantas pueden ser divididas en tres grandes grupos. Las "plantas de día largo" son aquellas que florecen más rápido, o solamente, cuando la etapa lumínica del día excede una cantidad umbral de horas de luz. Este grupo incluye mayormente aquellas plantas que florecen durante la primavera o comienzo del verano, momento del año donde la cantidad de horas de luz alcanza su máximo anual. Las "plantas de día corto", en oposición, son aquellas que florecen más rápido, o solamente, cuando las horas de luz disminuyen por debajo de un umbral, es decir, durante el otoño o invierno. Por último, el tercer grupo de plantas denominadas "de día neutro" son aquellas que florecen independientemente de los estímulos fotoperiódicos⁸². Arabidopsis es una planta de día largo facultativa, ya que logra florecer

tanto en días cortos como largos, pero lo hace anticipadamente en días largos.

Cabe destacar que son múltiples las vías que convergen en la regulación de la floración de plantas, y que en los distintos fotoperíodos serán diferentes las vías que dominen esta transición. Es así como en un fotoperíodo de día corto (8h de luz, 16h de oscuridad) será la vía denominada como autónoma la que determine la transición a la etapa reproductiva, mientras que en un fotoperíodo de día largo (16h de luz, 8h de oscuridad) será la integración de la señal fotoperiódica del ambiente al estado interno controlado por el reloj biológico, lo que finalmente promueva el proceso de floración. Este proceso gobernado por el reloj circadiano ha sido ampliamente estudiado y es explicado mediante el "modelo de coincidencia externa"^{80,83,84}, denominado así dado que el mismo propone como condición para esta transición la coincidencia de ritmos internos controlados por el reloj e información externa fotoperiódica.

Para que esta transición suceda es necesaria la activación en las hojas del gen FLOWERING LOCUS T (FT), lo cual es seguido por la translocación de la proteína FT (tradicionalmente conocida como FLORÍGENO) al meristema apical de la planta donde actúa como factor de transcripción, induciendo la expresión de múltiples genes de identidad floral. Para que esto suceda es necesario la activación de CONSTANS (CO), un factor de transcripción del tipo "zinc fingers", que se une directamente al promotor de FT promoviendo su transcripción^{85,86}. La expresión de CO es regulada por el reloj circadiano, y solo cuando este gen se transcribe en períodos que coinciden con la presencia de luz, los niveles de esta proteína se vuelven detectables, ya que la luz promueve su estabilidad⁸⁷. Por otro lado, la inducción de la transcripción de CO requiere la acción de un complejo proteico formado por FLAVIN KELCH BOX (FKF1) y GIGANTEA (GI), dos componentes del reloj de expresión circadiana^{49,88} que interactúan entre sí y median la degradación de los CYCLING DOF FACTORS (CDFs), represores transcripcionales de CO⁸⁹. Un aspecto

clave de este proceso es que en días cortos GI presenta un pico de expresión al atardecer, mientras que la acumulación de la proteína FKF1 llega a su pico por la noche, por lo cual estas no son capaces de interactuar y la liberación transcripcional de CO no acontece. En cambio, en días largos el pico de ambas proteínas coincide por la tarde, con lo cual la formación del complejo FKF1-GI sí sucede, conduciendo a la activación de la expresión de CO⁹⁰. En paralelo, la proteína FKF1 activada por la luz es también reclutada al promotor de FT donde estimula directamente su transcripción y acumulación⁹⁰. Entonces, la coincidencia de señales lumínicas al atardecer de días largos interactúa con componentes regulados por el reloj, llevando a la represión de represores de FT y estabilizando o activando inductores de la floración.

Respuestas a estrés biótico

La incapacidad de las plantas de relocalizarse frente a señales de estrés ambientales ha llevado a que a lo largo de su proceso evolutivo estas desarrollasen sofisticados mecanismos de respuesta tanto a estímulos bióticos como abióticos. No obstante, la expresión constitutiva de las vías de defensa resulta en detrimento de la vida vegetal. En relación a ello, la hipótesis de la defensa óptima (HDO) propone que la planta debe asignar recursos de defensa únicamente a los tejidos más valiosos en lo que a *fitness* respecta, o más vulnerables a patógenos y/o herbívoros⁹¹. Por ejemplo, tejidos jóvenes sumideros y estructuras reproductivas presentan niveles más elevados de metabolitos de defensa, así como respuestas más fuertes ante infecciones con respecto a otras partes de la planta⁹². De esta manera se minimiza el efecto negativo sobre el *fitness* global de la planta que, en cuanto a costo energético, representa la activación de vías de defensa. En años recientes, esta teoría se ha expandido para incorporar un componente temporal a esta cuidadosa regulación en la asignación de recursos. Esta noción es sustentada por evidencias que demuestran que las plantas utilizan su reloj circadiano para restringir temporalmente tanto los mecanismos de defensa basales

como aquellos inducibles, a momentos del día donde la amenaza de ataques por parte de patógenos o herbívoros es más elevada⁹³.

LA RESPUESTA INMUNE EN LAS PLANTAS

Dado que los sistemas vegetales no presentan un sistema inmune con células especializadas para dicha función, cada célula individualmente presenta múltiples mecanismos de defensa que pueden ser agrupados en cuatro categorías según su modo de acción o el estadio de infección en el cual participen. Estas son las barreras físicas, la inmunidad gatillada por patrones moleculares, la inmunidad gatillada por efectores, y la resistencia sistémica adquirida.

Barreras Físicas

En primera instancia, las plantas cuentan con barreras físicas que impiden el ingreso de agentes patogénicos al interior del sistema. Esta defensa pasiva, está compuesta por estructuras de la superficie de la planta, como son los tricomas, la cutícula, las células epidérmicas y los estomas⁹⁴⁻⁹⁶. Algunos metabolitos secundarios preexistentes, como saponinas y glucosinolatos, también pueden colaborar en esta primera línea de defensa⁹⁷.

En simultáneo existen mecanismos de defensa activos, capaces de reconocer la presencia de patógenos por métodos independientes y así desencadenar las subsecuentes vías de señalización y respuesta correspondientes.

Inmunidad gatillada por patrones microbianos

En el primer sistema inducible, los mecanismos de inmunidad son disparados por la detección de marcas bacterianas conservadas denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (*PAMPs*, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) o microbios (*MAMPs*, del inglés *microbe-associated molecular patterns*). Estos incluyen fragmentos de flagelina bacteriana, lipopolisacáridos (LPS) y péptidoglicano de pared celular de bacterias, chitina de pared celular de hongos y una gran variedad de moléculas o estructuras conservadas en grupos microbianos, ausentes en la

planta hospedera⁹⁸. Estos patrones son reconocidos por receptores ubicados en la membrana plasmática que reconocen dichos patrones conservados (*PRRs*, del inglés *pattern recognition receptors*), los cuales son responsables de activar una respuesta inmune en respuesta a un amplio espectro de patógenos. Este mecanismo de defensa es denominado inmunidad gatillada por patrones (*PTI*, del inglés *pattern-triggered immunity*).

Ante la percepción de PAMPs o MAMPs por parte de los PRRs, se produce un reclutamiento de co-receptores en el citosol que forman complejos proteicos auto y trans-fosforilables⁹⁹, que desencadenan diferentes procesos moleculares y bioquímicos, mediando así la diversidad de respuestas celulares y fisiológicas que culminan en la PTI. El acomplejamiento y fosforilación de estos receptores tiene como consecuencia en primera instancia la activación de cascadas de activación de proteínas kinasas activables por mitogeno (*MAPKs*, del inglés *mitogen-activated protein kinases*) y kinasas dependientes de calcio (*CDPKs*, del inglés *calcium-dependent protein kinases*), que regulan cambios en los perfiles transcripcionales de genes, así como otras respuestas celulares^{100,101}. Entre las respuestas gatilladas se puede identificar un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} ¹⁰² que genera en consecuencia una apertura de transportadores de otros iones, llevando así al ingreso de H^+ y a la salida de K^+ y Cl^- , lo que genera finalmente una alcalinización del medio extracelular y una despolarización de la membrana plasmática¹⁰². Otra de las marcas clásica detectadas en esta respuesta es el denominado estallido o "burst" oxidativo de especies reactivas de oxígeno tales como iones superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH)¹⁰³. Estos actúan como una barrera de toxinas para evitar subsecuentes infecciones patogénicas, conducen al fortalecimiento de las paredes celulares por entrecruzamiento oxidativo de polímeros y funcionan también como versátiles moléculas de señalización, mediando múltiples vías de respuesta^{103,104}. El *burst* oxidativo es detectable tan solo unos minutos luego de la detección de PAMPs o MAMPs, y suele estar acompañado por la producción de otros compuestos como óxido

nítrico (NO) y ácido fosfatídico (PA) que también actuarían como mediadores de algunas respuestas de defensas^{104,105}. Otra respuesta clave en este proceso es la de cierre de estomas, dado que estos representan una de las principales vías de entrada de patógenos al interior de la planta. Esta respuesta puede ser observada tan solo una hora luego de la detección de señales de infección¹⁰⁶. Otros procesos de remodelación estructural incluyen también la rápida y temporaria remodelación de filamentos de actina¹⁰⁷, la deposición de calosa como barrera física para el refuerzo de la pared celular¹⁰⁸, así como para el cierre de plasmodesmos, cuya permeabilidad influye en el resultado de la interacción planta-patógeno¹⁰⁹. Por último, otro proceso clave en este despliegue defensivo es la producción de metabolitos secundarios que son sintetizados *de novo* ante señales de estrés. Estos compuestos antimicrobianos se denominan fitoalexinas e incluyen una gran diversidad de compuestos, siendo una de las mejores caracterizadas la Camalexina, un derivado del triptofano¹¹⁰.

Cabe destacar que algunas hormonas de plantas, como el ácido salicílico (AS), el etileno (ET) y el ácido jasmónico (AJ), también han sido implicadas en las respuestas relacionadas a la PTI¹¹¹. Tradicionalmente se ha considerado al AS como la principal hormona necesaria para las respuestas ante ataques biotróficos (seres vivos que se alimentan y reproducen en las células vivas del hospedador), como por ejemplo la bacteria patogénica *Pseudomonas syringae*, mientras que el ET/AJ han sido considerado más importantes para el ataque ante seres necrotróficos (quienes al atacar la célula huésped la matan para nutrirse y multiplicarse), como pueden serlo algunos hongos o animales masticadores¹¹¹. De hecho, en muchos casos las señales activadas por AS y ET/JA pueden ser mutuamente inhibitorias¹¹¹. No obstante, la biosíntesis de todas estas hormonas es inducida ante la señal de detección de PAMPs¹¹²⁻¹¹⁶ y, al analizar mutantes de *Arabidopsis* deficientes en las vías de estas hormonas, se ha identificado que tanto AS, como ET y AJ son necesarios para la activación de las respuestas de defensa de la PTI, contribuyendo principalmente a los pasos más tardíos de este proceso¹¹⁷.

Adicionalmente, otras fitohormonas, incluidos los brasinoesteroides, auxinas, ácido abscísico (ABA), citoquininas y giberilinas también se encuentran implicadas en la inmunidad de plantas¹¹⁸.

Susceptibilidad gatillada por efectores

A pesar de la plétora de mecanismos desarrollados para responder ante una señal de ataque, la historia co-evolutiva de la interacción planta-patógeno ha moldeado los mecanismos de interacción entre hospedador y huésped, llevando a que patógenos exitosos desarrollen estrategias capaces de suprimir algunas de las respuestas involucradas en la PTI de plantas¹¹⁹. Este efecto es logrado a través de la implementación de proteínas "efectoras". Cada fito-patógeno puede llegar a generar entre 20-30 tipos de efectores diferentes que son secretados al citoplasma de la célula vegetal a través de diferentes mecanismos. En el caso de bacterias patógenas un sistema de secreción de tipo III (TTSS, del inglés *type-III secretion system*)¹²⁰ consta de un pili a través del cual se inyectan efectores al citosol. Bacterias deficientes en los TTSS resultan no patogénicas. Por otro lado, hongos y oomicetos utilizan haustorios u otras estructuras intracelulares desconocidas para esta misma función.

El repertorio de efectores varía dramáticamente, incluso entre cepas bacterianas estrechamente relacionadas, y estos presentan funciones redundantes, resultando aparentemente intercambiables entre sí¹²¹. Muchos de estos efectores tienen como objetivo principal el interferir con las respuestas de la PTI¹²², aunque algunos otros pueden actuar también como factores de transcripción, promoviendo directamente la expresión de genes de la planta que contribuyen al desarrollo de síntomas¹²³. Globalmente, a esta estrategia patogénica que opera debilitando a la planta, se la denomina susceptibilidad gatillada por efectores (ETS, del inglés *effector triggered susceptibility*).

Inmunidad gatillada por efectores

En esta carrera armamentista entre hospedadores y patógenos las plantas han desarrollado también mecanismos que en algunos casos son capaces de detectar efectores dentro de la célula. Los componentes claves involucrados en este proceso pertenecen a una familia de receptores intracelulares polimórficos denominados NLR (del inglés nucleotide-binding/leucine-rich-repeat receptors) que se encuentran codificados por los genes denominados de resistencia (genes R). Estos son los encargados de detectar (ya sea directa o indirectamente) efectores patogénicos y así desencadenar una segunda vía de respuesta inmune activa, denominada inmunidad gatillada por efectores (ETI, del inglés *effector-triggered immunity*), la cual eventualmente pone freno al crecimiento bacteriano¹²⁴. En consecuencia, aquellos efectores bacterianos reconocibles por proteínas codificadas en genes R, son denominados factores de avirulencia (avr), dado que al ser detectados por la célula hospedera limitan la capacidad infectiva del patógeno.

Si bien las vías de reconocimiento de señales patogénicas que desencadenan la PTI y la ETI son muy distintas, las vías de señalización río abajo de una y otra, así como los mecanismos de respuesta empleados en ambos casos se superponen considerablemente, razón por la cual muchas veces la ETI es considerada como un refuerzo e incluso una versión más robusta y amplificadora de la PTI^{115,118}. Mayormente el desenlace de la ETI suele ser una muerte celular programada restringida al sitio de infección, lo cual se denomina respuesta hipersensible (HR, del inglés *hypersensitive response*)¹²⁵.

Resistencia sistémica adquirida

En una última capa de defensa, la infección por parte de un patógeno avirulento puede llevar no solo a una respuesta localizada, sino también a la producción de compuestos de señalización que lleven la señal de infección a tejidos distales de la planta. El objetivo de este mecanismo es entonces promover la producción sistémica de proteínas de acción antimicrobiana,

por la activación de genes de respuesta a patógenos (PR, del inglés *pathogenesis-related*), en zonas aun no infectadas. A este mecanismo se lo denomina resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés *systemic acquired resistance*) y tiene la función de proteger los tejidos no infectados, preparando así a la planta para anticipar una posible nueva infección¹²⁶.

El SAR promueve una protección de amplio espectro frente a hongos patogénicos, virus y bacterias, así como una suerte de "memoria" inmune que puede durar semanas y hasta meses. Si bien se ha demostrado que el ácido salicílico es un compuesto indispensable para el montado del SAR, este solo es requerido en el tejido sistémico¹²⁷, con lo cual hasta el momento no se conoce cual es en sí la señal móvil que viaja desde la célula infectada donde la ETI se ha desencadenado a los tejidos distales no infectados¹²⁶.

Regulación circadiana del sistema inmune en plantas

De acuerdo con la hipótesis de la defensa óptima (HDO), las plantas regulan temporalmente su sistema inmune de manera tal de balancear los mecanismos de defensas, costosos a nivel energético, con otras funciones celulares vitales, como el crecimiento.

Una de las primeras observaciones que dieron indicio de una regulación circadiana de las vías de respuesta a estrés biótico, fue la identificación de oscilaciones circadianas en los niveles de expresión de un gen que es rápidamente inducido ante una infección con *Pseudomonas syringae*, denominado *PATHOGEN AND CIRCADIAN CONTROLLED 1 (PCC1)*¹²⁸. Posteriormente, esta observación puntual fue ampliada a través del implemento de modelados matemáticos, en los cuales se predijo que múltiples genes de respuesta a patógenos podrían estar sujetos a una regulación circadiana, a raíz de la identificación de sitios de unión en sus promotores para uno de los genes centrales del reloj, *CCA1*^{129,130}. Este concepto fue reforzado mediante el análisis de datos de microarreglos donde se confirmó que tanto genes involucrados en las vías de defensa de la PTI como genes

relacionados a la ETI, presentan oscilaciones del tipo circadiano^{130,131}. En algunos casos estas fluctuaciones rítmicas pueden ser abolidas por la ausencia de CCA1¹³⁰. Dichas observaciones concuerdan con el hecho que en múltiples ensayos de inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación (ChIPseq) para diversos componentes del reloj, incluidos CCA1, TOC1, PRR5, PRR7 y PRR9, se haya identificado dentro de los targets de regulación de estas proteínas un enriquecimiento en genes relacionados a respuestas de estrés^{70,132-135}.

Si bien durante mucho tiempo se supo que las condiciones lumínicas ambientales, íntimamente ligadas al funcionamiento del reloj, tenían una fuerte influencia en el resultado de la interacción entre planta y patógeno¹³⁶, la prueba definitiva de la regulación directa de las defensas por parte del reloj se obtuvo mediante ensayos de infección realizados en condiciones de libre curso (luz continua). Al infectar plantas de *Arabidopsis* por infiltración de hojas con la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*) se pudo observar una variación temporal en la susceptibilidad de la planta. Esta se mostró más resistente por la mañana subjetiva que por la noche subjetiva¹³¹. Un resultado similar se obtuvo al tratar hojas de *Arabidopsis* con el hongo ascomiceto *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*)¹³⁷. Estos resultados coincidieron con trabajos previos donde se había identificado por primera vez la oscilación de genes de respuesta a patógenos, en los cuales los picos de expresión de estos genes se sucedían por la mañana¹³⁰. En aquel caso, los autores estudiaron las respuestas a infecciones por un oomiceto patogénico, *Hyaloperonospora Arabidopsis* (Hpa), cuya diseminación de esporas sucede al amanecer. En relación a ello los autores propusieron que el fortalecimiento de las defensas de la planta por la mañana, dirigido por el reloj circadiano, podría ser una estrategia de la planta para anticipar un posible ataque en aquel momento del día donde las condiciones ambientales resultan más favorables para la dispersión del patógeno¹³⁰.

Cabe destacar que en otro estudio se identificó también una regulación circadiana de las defensas por medio de la regulación de la apertura estomática. En este caso pareciera ser que la apertura de estomas durante el día y el cierre de estomas por la noche llevan a que las defensas físicas sean más fuertes por la noche que por la mañana¹²⁹. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían sugerir que a lo largo del día las plantas utilizan diferentes mecanismos de defensa. Podría ser que durante la noche las defensas de las plantas dependan mayormente de barreras que físicamente restrinjan la entrada de patógenos dentro del sistema vegetal, como es el caso de los estomas, manteniendo bajas a su vez las defensas que operan en forma independiente de dichas barreras. En cambio, durante el día cuando los estomas se encuentran mayormente abiertos, la planta podría estar compensando este aumento en las vías de entrada de patógenos con el fortalecimiento de mecanismos de defensa que operan en forma independiente a los estomas¹²⁹.

Más allá del mecanismo de defensa empleado en cada caso, ensayos realizados con mutantes deficientes en genes centrales del reloj han demostrado la relevancia del mismo en estos procesos. Es así que al afectar genes maestros del reloj, como es el caso de la sobre-expresante de *CCA1* (*CCA1-ox*) o la mutante nula para *ELF3* (*elf3-1*), se pierde la regulación temporal de las defensas, dejando a la planta igual de susceptible por la mañana que por la noche, tanto ante a una infección con *P. syringae* como una infección con *Hpa*^{130,131}. En adición, de acuerdo con el hecho que el reloj pareciera fortalecer temporalmente los mecanismos de defensa por la mañana, mutantes deficientes en genes de expresión matutina como *CCA1* y *LHY*, así como la doble mutante para *cca1/lhy* resultan ser más susceptibles a las infecciones por bacterias patogénicas como *Pseudomonas*, hongos biotróficos como *Hpa* y hongos necrotróficos como *B. cinérea*^{129,130,137}. En concordancia, en mutantes nulas para uno de los genes centrales de la tarde, *TOC1* (*PRR1*), se ha detectado una mayor resistencia inducida por SA frente a la infección con *P. syringae*¹³⁸.

No obstante, mutantes sobre-expresantes de los genes de mañana no presentan una relación tan clara con los niveles de susceptibilidad o resistencia. Mientras que *CCA1-ox* y *LHY-ox* resultan más susceptibles a *Pseudomonas*¹²⁹, *CCA1-ox* pareciera ser más resistente a *Hpa*¹³⁰. Por otro lado, algunas mutantes nulas de genes de la tarde, como *ztl*, *lux* y *elf3* resultan también susceptibles a infecciones bacterianas o fúngicas^{130,131,139}. Es así que los trabajos realizados hasta el momento con mutantes simples o dobles para genes centrales del reloj parecieran señalar que no existe una relación predecible entre el momento de expresión de estos genes y su efecto sobre las defensas, dado que tanto la falta de genes de la mañana como de la noche pueden llevar a una susceptibilidad exacerbada. Por otro lado, tampoco pareciera ser que el cambio en el funcionamiento del oscilador por sí mismo pudiese predecir el resultado de la interacción planta-patógeno dado que, tanto mutantes que resultan en un período corto (por Ej. *cca1* y *lhy*), como mutantes sobre-expresantes arrítmicas (como *CCA1-ox* o *LHY-ox*) resultan en fenotipos susceptibles a la infección por *P. syringae*¹⁴⁰.

Es así que los mecanismos moleculares que gobiernan la regulación circadiana de las defensas no se encuentran del todo claros hasta la fecha. No obstante, muchos trabajos realizados en el área en la última década refuerzan la idea de un rol fundamental del reloj biológico en el control del sistema inmune de las plantas, posicionando así a las respuestas a estrés biótico como un claro *output* del reloj circadiano.

Efecto del estrés biótico sobre el reloj circadiano

Dado que múltiples procesos asociados al reloj, en un principio identificados como *outputs* pueden funcionar en simultáneo como *inputs*, y viceversa, en años recientes el estudio de la relación entre reloj y defensas ha adquirido un nuevo nivel de complejidad al adentrarse en el estudio de una posible retroalimentación regulatoria entre estos.

Al desafiar una planta con un patógeno, una de las múltiples respuestas gatilladas es una masiva reprogramación

transcripcional¹⁴¹. Cantidad creciente de evidencia pareciera señalar que este efecto también influencia genes del reloj circadiano.

En los primeros ensayos realizados se mostró que la infección de plantas de *Arabidopsis thaliana*, tanto con cepas virulentas como avirulentas de *Pseudomonas syringae* (pv. tomato DC3000), genera un acortamiento en el período asociado a la expresión del gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de *CCA1* (*CCA1::luc*)¹³¹. Luego, se observó que tratamientos prolongados con ácido salicílico (SA), hormona asociada a la señalización de respuesta a patógenos, aumenta la amplitud en la expresión y nivel de expresión promedio en un gen de la tarde, *TOC1*, así como en un gen la mañana, *LHY*¹³⁸. En contraposición, en otro estudio se demostró que tratamientos transitorios con SA llevan a la disminución de la amplitud en la expresión de *CCA1/LHY*, así como *TOC1*¹⁴². Estos autores también detectaron un alargamiento de los períodos asociados a las oscilaciones en la expresión de reporteros para genes centrales del reloj como *LHY* (*LHY::luc*) y *TOC1* (*TOC1::luc*)¹⁴².

De este modo, a pesar de las discrepancias observadas en los resultados, una conclusión común pareciera ser que frente a una señal de ataque patogénico se sucede en consecuencia una desregulación masiva de la expresión de genes del reloj circadiano. De acuerdo a lo propuesto por Zhou et.al, este efecto podría ser un mecanismo de la planta para reforzar su función circadiana, balanceando así la asignación de recursos entre la respuesta inmune y el metabolismo primario¹³⁸. Por otro lado, estas perturbaciones circadianas podrían representar también una estrategia adaptativa de patógenos, cuyo objetivo principal fuese la disrupción de la homeostasis vegetal, con la finalidad de adquirir una ventaja en la colonización del sistema hospedero.

OBJETIVO

El objetivo general de nuestra investigación es profundizar el conocimiento de los mecanismos moleculares que median la regulación del reloj biológico de las plantas en respuesta a señales ambientales.

El objetivo específico de este proyecto es detectar actores involucrados en mediar la relación entre el reloj biológico de *Arabidopsis thaliana* y los procesos de respuesta frente a estímulos ambientales asociados a señales de estrés biótico.

Hipótesis

La hipótesis inicial del presente trabajo es que dada la regulación circadiana detectada en los múltiples niveles del sistema inmune de plantas y la implicancia de componentes del oscilador central del reloj biológico en los mecanismos de defensa, genes tradicionalmente asociados a respuestas de estrés biótico podrían tener un rol recíproco en la regulación del reloj circadiano. Una segunda hipótesis supone que señales ambientales de estrés biótico podrían alterar el funcionamiento de la red de regulación circadiana de modo de facilitar procesos infectivos.

Materiales y
 Métodos

Material vegetal

Todas las mutantes utilizadas en este estudio se encuentran en el fondo génico de la accesión Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas mutantes *pad4-1* (CS3806), *ndr1-1* (CS68768), *npr1-1* (CS3726), *nup205-1* (SALK_055559), y *nup205-3* (GK_155G03) fueron obtenidas del *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC). La doble mutante *lnk1-1;lnk2-1* (*lnk1-1/SALK_024353* y *lnk2-1/GK_484F07*) fue descrita en Rugnone et al.²⁸. Las mutantes *lnk3-1* (SALK_085551C), *lnk4-1* (GK_846C06) son idénticas a las utilizadas por Xie et al.²⁹ y sus semillas fueron obtenidas de la colección de mutantes por inserción de T-DNA del *Arabidopsis Biological Research Center* (ABRC). La cuádruple mutante *lnk* fue obtenida en nuestro laboratorio mediante la cruce de mutantes dobles y simples. La verificación de las mutantes dobles y cuádruples fue realizada mediante el análisis por PCR.

Condiciones de crecimiento

Dependiendo del experimento, las plantas fueron crecidas en sustrato inerte, a 22°C, en condiciones de día largo (LD, ciclos de 16h de luz y 8h de oscuridad con 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz blanca), día corto (SD, ciclos de 8h de luz y 16h de oscuridad con 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz blanca) o luz continua (LL, con 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz blanca).

Genotipado de mutantes

Para verificar que las poblaciones de semillas mutantes adquiridas poseían la inserción de T-DNA en ambos alelos del loci de interés se procedió a su genotipificación mediante reacciones de PCR. Se cultivaron las plantas y cuando poseían entre 6-8 hojas se tomó una muestra de tejido foliar y se realizó una extracción de ADN¹⁴³. Para las mutantes *lnk* se utilizaron primers ya reportados en trabajos previos^{28,29}. Para el diseño del resto de los primers se empleó el software Beacon

Designer 5.0 (Premier Biosoft International) y se siguió el protocolo de diseño de primers del SIGnAL (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), donde un set de primers específicos para cada alelo mutante (LP y RP) amplifica el alelo salvaje, mientras que otro set (RP y LBFGH o LB3) amplifica el alelo que contiene la inserción de T-DNA. Los primers LBFGH y LB3 hibridan en la inserción de T-DNA con lo que se emplean en todas las mutantes. Para las reacciones de PCR se empleó la enzima Taq DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto de las reacciones de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% revelado con bromuro de etidio (concentración final: 0,5µg/ml).

Ensayo de movimiento de hojas

Para el análisis del movimiento de hojas, las plantas fueron crecidas en un fotoperíodo de día largo (16h luz, 8h oscuridad) hasta que el primer par de hojas estaba completamente desarrollado, a este período se lo conoce como entrenamiento. Luego fueron transferidas a una cámara de luz blanca continua con una irradiancia de 20 µmol.m⁻².s⁻¹ a 22°C, donde se las fotografió cada 2h por 5-6 días con cámaras digitales. En cada fotografía se midió el ángulo formado por el primer par de hojas empleando el software ImageJ¹⁴⁴. Finalmente, se determinó el período de la oscilación del ángulo entre el primer par de hojas empleando un análisis de FFT-NLLS (Fast Fourier Transform-Nonlinear Least Squares) disponible en el software Brass 3.0 (Biological Rhythms Analysis Software System). Estos experimentos se realizaron al menos 3 veces con un n=5 para cada genotipo. El análisis estadístico para las comparaciones de pares entre mutantes de patógenos o nucleoporinas y plantas salvajes se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas (p≤0,05). Para la comparación entre sí de las mutantes *lnk* y con respecto al wt, se utilizó un análisis de ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey de comparaciones múltiples.

Ensayos de elongación de hipocotilos

Para la medición de la inhibición de la elongación del hipocotilo se crecieron plántulas en cajas, conteniendo medio agar- agua 0,8%, en completa oscuridad, luz roja continua (de 0,01 a 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), luz azul continua (de 0,1 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), luz blanca continua y ciclos de luz blanca en LD y SD. Las semillas fueron estratificadas en condiciones de oscuridad y frío (4°C) por cuatro días y luego se les dio un pulso de dos horas de luz roja para inducir la germinación. Finalmente fueron expuestas a los tratamientos correspondientes. Luego de 4 días en el tratamiento lumínico, se midió el largo de los hipocotilos. Los efectos de la luz sobre la elongación del hipocotilo fueron evaluados relativizando el largo del hipocotilo en cada tratamiento lumínico al largo del hipocotilo de las plántulas del mismo genotipo en el tratamiento de oscuridad. Estos experimentos se realizaron 6 veces por tratamiento, midiendo 10 plántulas por genotipo y por tratamiento en cada repetición. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas ($p \leq 0,05$).

Ensayos de tiempo de floración

El tiempo a floración se determinó contando el número de hojas en la roseta de la planta ya inducida la floración, cuando el escape floral tenía aproximadamente 1cm. El número de hojas de la roseta fue determinado para cada planta como indicador de la duración de la fase vegetativa del desarrollo. De este modo uno estima el tiempo biológico que tarda en florecer independizándose de su velocidad de crecimiento¹⁴⁵. Estos experimentos se realizaron por triplicado con n=12 plantas por genotipo en cada ocasión. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas ($p \leq 0,05$).

Ensayos de bioluminiscencia

Para los ensayos de bioluminiscencia, líneas transgénicas para el genotipo wt y mutante *eds4* fueron obtenidos mediante transformación con las construcciones *CCA1::LUC* y *TOC1::LUC*,

utilizando la técnica de inmersión floral¹⁴⁶. Plántulas fueron crecida en placas multiwell de 96 pocillos con medio rico Murashige y Skoog 0,8% (p/v) agar, suplementado con sacarosa 1% (p/v). Una semilla fue posicionada por pocillo y las plántulas entrenadas en ciclos de 16h luz y 8h oscuridad. Luego de 7 días de entrenamiento la placa completa fue transferida a condiciones de luz constante y posicionada en un luminómetro de micro-placas LB-960 (Berthold Technologies) para la medición de la luminiscencia emitida por cada plántula cada hora. Luego de 5-6 días de medición, la información recolectada fue analizada utilizando el software Mikrowin 2000 (versión 4.29). Los períodos fueron determinados utilizando un análisis de FFT-NLLS (Fast Fourier Transform-Nonlinear Least Squares) disponible en el software Brass 3.0 (Biological Rhythms Analysis Software System). Estos experimentos se realizaron por duplicado con un n=6 para cada una de cuatro líneas transgénicas independientes obtenidas para ambas construcciones en cada genotipo. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas ($p \leq 0,05$).

Re-secuenciación del genoma completo de Col-0 y *eds4*

Un total de cuatro muestras fue preparado: una sola planta *eds4*, una sola planta wt Col-0, un conjunto de 60 plantas *eds4* y un conjunto de 60 plantas Col-0. El ADN fue aislado utilizando un Plant DNeasy Kit (Qiagen), de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y luego procesado de acuerdo al protocolo del Truseq Nano DNA Library Prep Kit and protocol (Illumina). La fragmentación fue realizada utilizando ultrasonificación Covaris y se aplicó un paso de enriquecimiento mediante una PCR de 7 ciclos. La validación de las bibliotecas obtenidas fue realizada con un Agilent 2100 Bioanalyzer utilizando el Agilent DNA1000 Kit (Agilent Technologies) e incluyó una evaluación de tamaño y pureza. Las bibliotecas de ADN fueron secuenciadas de modo pair-end con un equipo Illumina HiSeq2000 en el laboratorio del Dr. Detlef Weigel en el Max Planck Institute for Developmental Biology (Tuebingen, Germany).

SHOREmapping

Los datos obtenidos a partir de la re-secuenciación de las muestras individuales, así como grupales de Col-0 y *eds4* fue analizada utilizando el software SHOREmap 3.0^{147,148}. Este análisis fue realizado por el Dr. Hequan Sun en una colaboración realizada con el laboratorio del Dr. Korbinian Schneeberger en el Max Planck Institute For Plant Breeding Research, Colonia, Alemania.

Validación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs)

Para la validación de los SNPs diferenciales identificados al comparar los genomas wt y mutante se utilizaron múltiples análisis independientes por dCAPS^{149,150}. Para el diseño de los primers de PCR y la selección de enzimas de restricción se utilizó la herramienta web dCAPS finder 2.0¹⁵⁰. Un protocolo de PCR estándar fue utilizado para la amplificación de las secuencias de interés y dichos amplicones fueron luego digeridos con las correspondientes enzimas de restricción y corridos en geles de agarosa 3% (p/v). Los primers y enzimas de restricción utilizados se encuentran detallados en la **Tabla suplementaria 1**.

Evaluación de la letalidad embrionaria

Silicuas completamente desarrolladas de Col-0 y *nup205-1* fueron fijadas en una mezcla de etanol/ácido acético (2:1) y luego clarificadas con una mezcla de hidrato cloral/glicerol/agua (8:1:2), de acuerdo a protocolos previamente descritos¹⁵¹. Las muestras fueron luego montadas, fotografiadas y las semillas abortadas fueron contadas en cada silicua. Estos experimentos se realizaron por duplicado, con un n=10 para cada genotipo. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas ($p \leq 0,05$).

Ensayo de resistencia a la infección bacteriana

Cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 fueron crecidas a 28°C en medio King's B (KB, 20 g proteasa peptona, 1.5 g K₂HPO₄, 6.09 ml MgSO₄ 1M, y 10 g glicerol por litro)

suplementado con rifampicina (100mg/l) y kanamicina (50mg/l) para la selección. Cultivos bacterianos frescos fueron recolectados, centrifugados y re-suspendidos a una concentración final de $OD_{600}=0.0002$ en $MgSO_4$ 10 mM. La solución bacteriana fue luego infiltrada por presión, utilizando una jeringa de 1ml sin aguja, en la cara abaxial de las hojas 8 a 10 de plantas de 5-6 semanas crecidas en condiciones de SD. Los ensayos de evaluación del crecimiento bacteriano fueron realizados 48 horas luego de la infección. Previo al recuento bacteriano la superficie de las hojas tratadas fue enjuagada con agua estéril. Un disco fue cortado de cada hoja y luego los 3 discos correspondientes a cada planta fueron colocados en 750 μ l de $MgSO_4$ 10mM, y machacados para liberar las bacterias. La solución resultante fue diluida por series y plaquada en gotas en medio sólido KB con los correspondientes antibióticos. Las placas fueron incubadas por 48hs a 28°C previo al recuento de colonias. Todos los experimentos de crecimiento bacteriano se realizaron al menos 3 veces con un $n=8$. El análisis estadístico para las comparaciones de a pares entre los alelos mutantes de NUP205 y plantas salvajes se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas ($p \leq 0,05$). Para la comparación entre sí de las mutantes *lnk* y con respecto al wt, se utilizó un análisis de ANOVA de una vía seguido de una prueba Tukey de comparaciones múltiples.

Análisis de la regulación circadiana del complejo del poro nuclear

Para el análisis de la regulación circadiana del complejo del poro nuclear (NPC) se utilizaron datos públicos de micro-arreglos disponibles en la herramienta virtual Diurnal del Mockler Lab (Donald Danforth Plant Science Center)¹⁵². Los datos de expresión de los diferentes componentes del NPC fueron agrupados según la clasificación en sub-complejos propuesta por Tamura et. al³³, resumida en la **Tabla suplementaria 2**.

Condiciones de crecimiento y protocolo empleado para la preparación de librerías de ADNc y secuenciación masiva

Para el análisis de expresión diferencial, se sembraron semillas en medio MS conteniendo 0,8% de agarosa, estas se estratificaron por 4 días en oscuridad a 4°C y se las pasó a una cámara de cultivo a 22°C bajo luz continua (80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz blanca). Transcurridos 12 días las plantas enteras fueron cosechadas y se realizó una extracción de RNA total empleando el kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para el análisis de la retención diferencial de transcriptos se aplicó un protocolo de purificación nuclear de acuerdo a lo descrito por Bologna et al. Mol Cell 2018¹⁵³. De manera breve, semillas de Col-0 y *eds4* fueron sembrada en medio MS y luego crecidas a 22°C en condiciones de luz continua. Luego de 10 días plántulas completas fueron cosechadas y el tejido fresco *cross-linkado* y fijado mediante la aplicación de vacío en un buffer de fijación a pH 7.5 (10 mM Tris, 10 mM Na₂EDTA, 100 mM NaCl, 0.1% (p/v) Triton X-100, 1% (p/v) formaldehído), por 7 minutos sobre hielo. Luego se agregó glicina a una concentración final de 0.125 M y las muestras fueron una vez más incubadas en vacío por 7 minutos sobre hielo. Las muestras fueron enjuagadas con buffer Tris, secadas e incubadas en 1-2 ml de un buffer de aislamiento de núcleos (15 mM Tris, 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM espermina, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 15 mM β -mercaptoetanol, 0.1% (p/v) Tritón X-100) antes de ser finamente disgregadas con una hoja de afeitar. El homogenato crudo fue filtrado y las preparaciones nucleares crudas fueron teñidas con DAPI y separadas utilizando un citómetro de flujo BD FACS Aria III. Luego del fraccionamiento, los núcleos fueron centrifugados por 60 min a 300 g y 4°C, sonicados en un equipo Bioruptor y su *cross-linkado* revertido por incubación con NaCl (concentración final 200 mM) y 40 μg de proteinasa K, durante 15 min a 50°C y 35 min a 65°C. El RNA fue extraído con fenol, precipitado en acetato de sodio, etanol y glucógeno, lavado en etanol 80% (v/v) y re-suspendido en agua libre de ARNasas. La purificación de

núcleos y posterior extracción de ARN fue una colaboración realizada por el Dr. Nicolás Bologna en el Swiss Federal Institute of Technology (ETH), en Zurich, Suiza.

Para determinar la concentración y calidad de las muestras se usó un NanoDrop 2000c (Thermo Scientific), un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) con un kit Agilent RNA 6000 Nano y electroforesis en gel. Las librerías fueron preparadas siguiendo las instrucciones de la TruSeq RNA Sample Preparation Guide (Illumina). De manera resumida, 3 μ g de ARN total fue purificado por sus colas de poly-A, fragmentado y una primer hebra de ADNc fue sintetizada utilizando una transcriptasa reversa (SuperScript II; Invitrogen) y hexámeros al azar. Esto fue seguido por degradación de ARN y síntesis de la segunda hebra de ADNc. Luego se realizó una reparación de los extremos y la adición de una sola adenosina al extremo 3', para permitir la ligación de adaptadores multiplex para la indexación de las muestras. Por último se realizó un paso de enriquecimiento mediante una PCR de 12 ciclos. Una vez obtenidas las librerías se validó la calidad de las mismas y se evaluó el tamaño de los amplicones obtenidos empleando un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) con un kit Agilent DNA1000. Las librerías se secuenciaron usando la tecnología de pair-end sequencing en un secuenciador Illumina HiSeq 1500 en el Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR). Para los ensayos de expresión diferencial de genes se secuenciaron tres o cuatro réplicas por genotipo (wt, n=4; eds4, n=3) y para el análisis de retención diferencial de transcritos, 2 réplicas por genotipo/fracción fueron secuenciadas.

Procesamiento de las lecturas de RNA-seq

Las lecturas obtenidas fueron mapeadas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10¹⁵⁴ usando TopHat v2.1.1¹⁵⁵ con los parámetros preestablecidos, a excepción de largo máximo de intrón que fue establecido en 5000pb. Finalmente, a partir de los archivos de alineación (archivos bam) generados y empleando scripts de R creados en el laboratorio se obtuvieron las tablas

de cuentas (counts) que permiten analizar la expresión diferencial en base al transcriptoma del TAIR10.

Análisis de expresión diferencial

Antes de proceder con el análisis se descartaron aquellos genes que poseían menos de 10 lecturas en promedio por condición. La expresión diferencial se determinó empleando el paquete edgeR version 3.4.2¹⁵⁶ ajustando los valores P resultantes usando el criterio de False Discovery Rate (FDR)¹⁵⁷. Genes con valores de FDR menores o iguales que 0,1 y con un Log_2 Fold Change absoluto mayor que 0,58 fueron considerados como diferencialmente expresados. Los análisis de superposición fueron realizados con la herramienta BioVenn¹⁵⁸.

Distribución diferencial de transcriptos

La distribución diferencial de transcriptos fue determinada estimando un número promedio de *counts* de secuenciación para cada uno de los transcriptos secuenciados en las muestras nucleares y totales de plantas wt y mutantes *eds4*. Luego se calculó la relación de la abundancia nuclear vs total y aquellos transcriptos que obtuvieron un valor >1 fueron considerados como enriquecidos en núcleos. Para esta selección de genes se calculó luego la relación existente para sus relaciones nuclear/total entre wt y *eds4*. Aquellos transcriptos que obtuvieron una relación de relaciones >2 fueron considerados como diferencialmente retenidos en la mutante.

Análisis de categorías funcionales enriquecidas

Las categorías funcionales asociadas a grupos específicos de genes fueron identificadas utilizando la herramienta BioMaps del software Virtual Plant (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb>) y fueron también manualmente curadas. A su vez, esta herramienta nos permite determinar que categorías funcionales están estadísticamente sobrerrepresentadas en una lista de genes particular en comparación con todo el transcriptoma¹⁵⁹. En cada una de las categorías funcionales se determinaron los genes en común con nuestros sets de datos, así como un factor de

representación (FR) y la probabilidad de que estas superposiciones sean por azar. Se define como factor de representación al número de genes en común observado dividido por el número de genes en común esperado en la superposición de dos grupos independientes de genes. Un factor de representación mayor a 1 indica mayor solapamiento de lo esperado por azar en dos grupos independientes de genes, mientras que un factor de representación menor que 1 indica un menor solapamiento que lo esperado. La probabilidad de cada solapamiento se determinó usando la fórmula de probabilidad hipergeométrica con un valor $p \leq 0,05$.

Medición por RT-PCR de la expresión de genes del reloj 1hpi

Las plantas fueron crecidas 5-6 semanas en condiciones de SD y luego ensayos de infección similares a los utilizados en la evaluación del crecimiento bacteriano fueron aplicados, inoculando *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 ($OD_{600}=0.002$) o una solución control ($MgSO_4$ 10 mM), 2 horas luego del prendido de las luces en el cuarto de cultivo (ZT=2). El tejido vegetal infectado fue cosechado 1 hora post infección (1hpi). Hojas de dos plantas diferentes fueron juntadas en cada muestra con el fin de reducir la variabilidad biológica, generando un total de tres muestras por genotipo y tratamiento. Se extrajo ARN total utilizando reactivo TRIzol (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Un microgramo de ARN fue tratado con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) y sujeto a una retro-transcripción por Super Script II Reverse Transcriptase (SSII RT) (Thermo Fisher Scientific) y oligo-dT, de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Los ADNc resultantes fueron luego amplificados utilizando un ciclador Mx3000P Real Time PCR System (Agilent Technologies). El transcripto del gen IPP2 (At3G02780) fue utilizado como referencia¹⁴². El análisis de RT-PCR cuantitativa fue realizado mediante el método de curva standard, acorde a los descripto en la *Methods and Applications Guide* de *Agilent Technologies*. Las secuencias de los primers utilizados se encuentran en la **Tabla Suplementaria 3**. Estos experimentos se realizaron por duplicado, con un n=4 para cada

genotipo y tratamiento. Para el análisis estadístico de los datos de expresión se utilizó un ANOVA de dos colas seguido de pruebas de Bonferroni. Asteriscos entre genotipos denotan interacción significativa entre tratamiento y genotipo (ns, no significativo, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Análisis de la morfología de hoja y biomasa

Para analizar la morfología de las hojas, plantas salvajes y mutantes *lnk* fueron crecidas en sustrato en condiciones de LD. Cuando las plantas tenían aproximadamente 30 días, su octava hoja fue cortada, escaneada y analizada con ImageJ¹⁴⁴. Luego se calculó para cada una la relación largo de la lámina/largo de la hoja completa. Estos experimentos se realizaron por triplicado, con un $n=10$ para cada genotipo. Para las mediciones de tamaño y biomasa, plantas salvajes y mutantes *lnk* fueron crecidas en sustrato en condiciones de SD. Al comienzo de la floración, sus rosetas fueron fotografiadas y su perímetro determinado utilizando ImageJ¹⁴⁴, dibujando digitalmente sobre cada imagen el círculo más pequeño capaz de abarcar la roseta completa. Luego, la biomasa aérea vegetativa total (escapos florales removidos) fue secada por 3 días a 40°C en sobres de papel y pesada. Estos experimentos se realizaron por duplicado, con un $n=18$ para cada genotipo. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas ($p \leq 0,05$).

Caracterización de la respuesta fototrópica en plantas adultas y plántulas

Para medir el ángulo entre las hojas de una roseta, las plantas fueron crecidas en sustrato a 22°C en condiciones de SD. Plantas de 6 semanas fueron fotografiadas de costado. El ángulo entre las dos hojas opuestas más cercanas a la fuente de luz fue medido utilizando el software ImageJ¹⁴⁴. Estos experimentos se realizaron por duplicado, con un $n=18$ para cada genotipo. Para la re-orientación fototrópica de las láminas foliares, las plantas fueron crecidas en condiciones de LD con iluminación superior. Luego de que el primer par de hojas verdaderas se encontrase completamente expandido, las plantas fueron expuestas

a una fuente de luz blanca lateral única ($50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sin iluminación superior. A aquellas hojas que acomodaron su lámina de manera perpendicular a la fuente de luz lateral se las consideró como re-orientadas. El número total de láminas foliares re-orientadas se contabilizó en plantas de 4 semanas. Estos experimentos se realizaron por duplicado, con un $n=12$ para cada genotipo. Para la caracterización de las respuestas fototrópicas en plantas jóvenes, las plántulas fueron germinadas en placas verticales durante 3 días en oscuridad y luego iluminadas de manera lateral con una fuente de luz azul ($1\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) única por 8-10 h. Las placas fueron luego escaneadas para las medición del ángulo de inclinación¹⁶⁰. Estos experimentos se realizaron por duplicado, con un $n=4$ para cada genotipo. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba t de Student de dos colas ($p\leq 0,05$).

Accesiones utilizadas

PAD4, At3g52430; *NDR1*, At3g20600; *NPR1*, At1g64280; *NUP205*, At5g51200; *LNK1*, At5g64170; *LNK2*, At3g54500; *LNK3*, At3g12320; *LNK4*, At5g06980.

Resultados

Identificación de candidatos a mediar la relación reloj-defensas

Estudios previos en la interacción de plantas y patógenos han establecido una fuerte influencia de la luz en el resultado de esta interacción. Además, evidencia creciente señala también la gran relevancia de una regulación circadiana en diversas respuestas inmunes^{128-131,139}. En conjunto, este marco de antecedentes teóricos nos llevó a explorar la relación existente entre el reloj biológico de plantas y las vías de respuesta a estrés biótico utilizando un enfoque complementario.

En estudios realizados con plantas mutantes para genes de las vías de señalización asociadas a estímulos lumínicos y mutantes deficientes en genes centrales del reloj biológico se encontró algún grado de susceptibilidad alterada frente a la infección patogénica. A raíz de esto nos propusimos explorar la inversa de esta relación, evaluando las respuestas a la luz y la función circadiana en mutantes previamente identificadas por su inmunidad comprometida. Entre ellas se encuentran *phytoalexin-deficient 1 (pad1)*¹⁶¹, *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)*¹⁶², *nonexpressor of PR genes 1 (npr1)*¹⁶³, *non race-specific disease resistance 1 (ndrl)*¹⁶⁴ y *phytoalexin-deficient4 (pad4)*¹⁶².

Con el fin de indagar las respuestas a estímulos lumínicos en este grupo de mutantes, en un primer paso se midió la inhibición de la elongación del tallo embrionario (hipocotilo) en plántulas de 3 días, en luz roja continua, en comparación con su crecimiento en oscuridad (**Figura 3a**). Luego, se evaluó su función circadiana mediante la determinación del período asociado al movimiento circadiano del primer par de hojas en plántulas de 8-10 días en condiciones de luz blanca continua, previamente entrenadas en un fotoperíodo de día largo (16h de luz, 8h de oscuridad) (**Figura 3b**). En ambos experimentos se observó que tan solo la mutante *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)* respondió de manera diferencial con respecto al control de planta salvaje (wt, del inglés *wild type*), presentando una sensibilidad disminuida ante la señal lumínica y un

funcionamiento alterado del reloj que resultó en un período largo asociado al movimiento de hojas (**Figura 3**). Estos resultados iniciales posicionaron a la mutante *eds4* como una candidata interesante para continuar con el estudio.

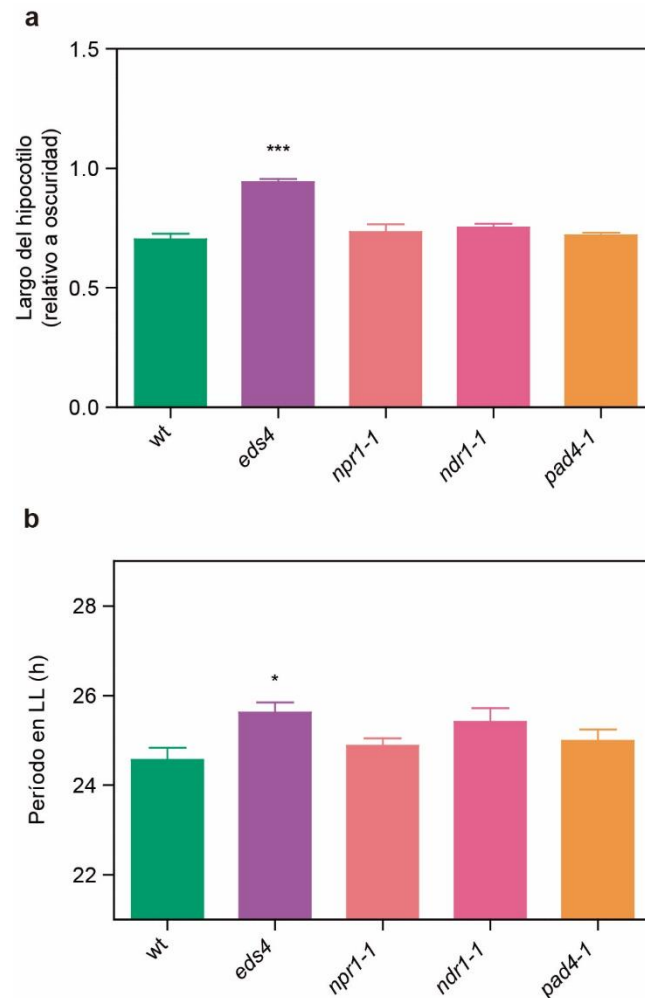


Figura 3. Análisis de las respuestas a la luz y función circadiana en mutantes defectuosas en la respuesta inmune. (a) Largo de hipocotilos de plántulas crecidas en luz roja continua (n=6 réplicas de 10 plántulas cada una). (b) Período de los ritmos circadianos asociados al movimiento del primer par de hojas verdaderas medido en luz continua luego de un entrenamiento en un fotoperíodo de día largo (16h de luz, 8h de oscuridad), estimado por FFT-NLS con el software BRASS 3.0 (n=3 experimentos independientes con 5 plantas por genotipo). Las barras de error indican el error estándar de la media (s.e.m). *P < 0.05; ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

Caracterización fisiológica de la mutante *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)*

La mutante *eds4* fue aislada originalmente a partir de una población de mutantes obtenidas por mutagénesis de semillas de *Arabidopsis thaliana* (accesión Columbia-0) con etil metano sulfanoato (EMS), en un estudio en el cual se buscaba identificar mutantes que presentaran un mayor grado de susceptibilidad frente a la infección con la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 (*Psm* ES4326), de allí su nombre en inglés *enhanced disease susceptibility (eds)*¹⁶². Dentro de estas mutantes defectuosas para la activación de las respuestas de defensa se aislaron nuevos alelos de genes de defensa ya conocidos, así como mutaciones novedosas, situadas en genes hasta el momento no caracterizados¹⁶².

Llamativamente, a pesar de haber transcurrido más de dos décadas desde el aislamiento de esta colección, y habiéndose caracterizado la identidad de los genes afectados en la mayoría de las mutantes *eds*, aún no se ha identificado la mutación responsable del fenotipo susceptible en algunas de ellas, como es el caso de la mutante *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)*. Algunas características de esta mutante, como una expresión disminuida de los genes de respuestas a patógenos ante una infección con *Psm* ES4326, una atenuada respuesta al tratamiento con la hormona de señalización del estrés biótico, ácido salicílico (AS), un impedimento para el establecimiento del SAR, así como una reducida acumulación de AS, parecieran indicar que EDS4 juega un rol en las vías de señalización mediadas por el AS¹⁶⁵. No obstante, hasta la fecha su identidad molecular continúa siendo una incógnita.

Con el fin de comprender mejor el rol e identidad de esta mutante realizamos una caracterización fisiológica más profunda de la misma, especialmente en relación a sus respuestas a la luz y la función circadiana. En lo que respecta a la señalización asociada a estímulos lumínicos *eds4* presentó diferencias significativas en el largo de sus hipocotilos con respecto de

plántulas wt crecidas en luz roja continua para todas las intensidades evaluadas, pero tan solo diferencias sutiles en el mismo ensayo realizado con luz azul (**Figura 4a y b**). Estos resultados parecieran indicar un grado de alteración en las vías de señalización de la luz roja, que son mediadas por el fitocromo B.

Dada la estrecha relación entre los inputs lumínicos y el funcionamiento del reloj biológico, a continuación evaluamos la elongación de los hipocotilos en luz blanca bajo distintos fotoperíodos. De esta manera observamos que si bien en condiciones de luz blanca continua (LL) *eds4* no presenta una respuesta de alargamiento del hipocotilo significativamente diferente con respecto al wt, en ambientes cíclicos como los son el día largo (LD, 16h luz; 8h oscuridad) y el día corto (SD, 8h luz; 16h oscuridad), la diferencia entre mutante y wt se incrementa (**Figura 4c**). Estos resultados refuerzan la idea de la existencia de un malfuncionamiento en el reloj de la mutante *eds4*. En concordancia con dicha noción se encontró también que otro clásico *otuput* controlado por el reloj, como lo es la transición a la etapa reproductiva se encuentra afectado en *eds4*. Es así que plantas mutantes para *eds4* florecieron prematuramente tanto en LD como en SD (**Figura 4d**).

Por último, identificamos que esta disfunción en la función circadiana observable a nivel global en la mutante *eds4*, posee su origen en lo que es la regulación a nivel transcripcional del oscilador central del reloj. Esto fue posible gracias a la transformación de las mutantes con construcciones que portan el gen reportero luminiscente de la luciferasa bajo el control de los promotores de genes centrales del reloj (CCA1::luc y TOC1::luc). De esta manera, el periodo largo originalmente detectado en el movimiento del primer par de hojas también fue observado en las oscilaciones asociadas a los niveles de expresión de los genes CCA1 y TOC1 (**Figura 4e y Figura suplementaria 1**).

En su conjunto, los resultados obtenidos confirman que además del ya conocido fenotipo afectado en las respuestas a patógenos, la mutante *enhanced disease susceptibility 4* presenta también novedosas deficiencias en algunas vías de la respuesta a la luz y una completa alteración del funcionamiento de su reloj circadiano.

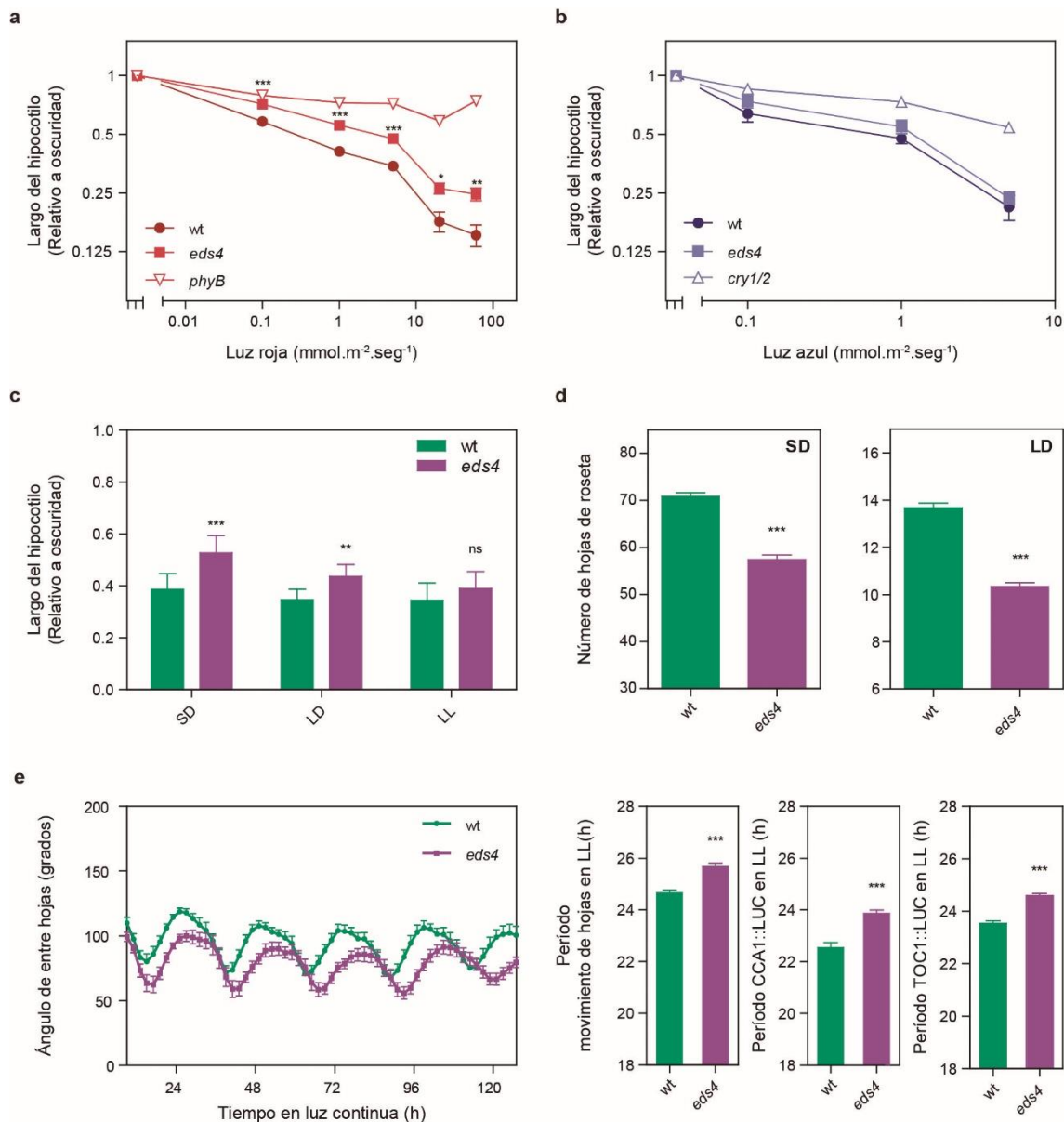


Figura 4. Caracterización fisiológica de la mutante *Enhanced Disease Susceptibility 4* (*eds4*). Largo de hipocotilos de plántulas crecidas en luz constante roja (**a**) o azul (**b**) (n=6 réplicas de 10 plántulas cada una). (**c**) Largo de hipocotilos de plántulas crecidas en fotoperiodos de día corto (SD, 8h de luz, 16h de oscuridad), día largo (LD, 16h de luz, 8h de oscuridad) o luz blanca constante (LL) (n=6 réplicas de 10 plántulas cada una). (**d**) Tiempo a floración, medido como el número de hojas presente en la

roseta al momento de la floración en LD y SD (n=12). (e) Ritmos circadianos en luz blanca continua luego de un entrenamiento en condiciones de LD. Para los ensayos de movimiento de hojas (paneles izquierdos), el ángulo entre el primer par de hojas verdaderas se midió en plántulas de 10 días al comienzo de la medición (n=5). En los ensayos de bioluminiscencia (paneles derechos), la actividad de CCA1::LUC y TOC1::LUC fue registrada cada hora durante 5 días en plántulas de 5 días al comienzo de la medición (n=6). El período asociado a los ritmos circadianos fue estimado por FFT-NLLS con el software BRASS 3.0. Las barras de error indican el s.e.m. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

Mapeo de la mutación responsable del fenotipo *enhanced disease susceptibility 4 (eds4)*

La dificultad principal encontrada en el pasado al intentar ubicar la mutación de *eds4* en el mapa génico fue que, a pesar de segregar como una mutación recesiva puntual en la accesión o ecotipo Columbia-0 (Col-0), en la cual fue originalmente identificada, al aplicar estrategias clásicas de mapeo mediante cruza con otros ecotipos de *Arabidopsis*, el patrón de segregación de la mutación en la descendencia no resultaba claro¹⁶⁵. Con esto en mente, y con el objetivo de desentrañar las bases genéticas responsables del fenotipo de *eds4*, decidimos aplicar una estrategia alternativa de mapeo, denominada mapeo por secuenciación.

Usualmente la carga de mutaciones puntuales originadas por el tratamiento con EMS tiende a ser alta. Como consecuencia, cualquier genoma mutante resultante poseerá uno, o unos pocos, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés *single nucleotide polymorphisms*) efectivamente responsables del fenotipo mutante y cientos o miles de mutaciones puntuales no relacionadas. Dado que ya se ha probado que *eds4* segrega como una única mutación puntual recesiva cuando la mutante es retrocruzada con una planta salvaje del ecotipo Col-0¹⁶⁵, nuestro primer paso en el proceso de mapeo fue realizar una nueva retrocruza de la mutante (en adición a las por lo menos 3 retrocruzas que ya habían sido realizadas en el pasado), con el fin de continuar removiendo SNP originados por mutagénesis que no fuesen responsables del fenotipo de *eds4*.

En paralelo, aplicando tecnología Illumina, realizamos una re-secuenciación de genoma completo de los parentales utilizados en la retrocruza *eds4* x Col-0. De esta manera, al contrastar las secuencias obtenidas de los genomas wt y mutante, haciendo uso de la herramienta bioinformática SHORE map tool^{147,148}, pudimos detectar dos regiones situadas en el cromosoma 1 y 5 de *Arabidopsis thaliana* enriquecidas en los típicos polimorfismos inducidos por EMS (transiciones C→T). Estas mutaciones puntuales introducían un total de 18 cambios no sinónimos de amino ácidos y un codón de finalización prematura de la traducción (**Tabla 1**).

Cromosoma	Posición	Base Ref.	Base Alt.	Región	ID Gen	Cambio	AAC de Ref.	AAC Alt.
1	11465962	C	T	Sec. codificante	AT1G31930.1	No sinónimo	P	L
1	11967367	C	T	Sec. codificante	AT1G33040.1	No sinónimo	P	S
1	12737870	C	T	5' UTR	AT1G34750.1	-	-	-
1	17433616	C	T	Sec. codificante	AT1G47500.1	No sinónimo	T	I
1	17646841	C	T	Sec. codificante	AT1G47890.1	No sinónimo	P	S
1	18664227	A	G	Sec. codificante	AT1G50380.1	No sinónimo	T	A
1	21595010	C	T	Sec. codificante	AT1G58250.1	No sinónimo	A	T
1	22082028	G	A	Sec. codificante	AT1G59980.1	No sinónimo	V	M
1	22123620	G	A	Sec. codificante	AT1G60050.1	No sinónimo	T	I
5	15459529	C	T	Sec. codificante	AT5G38600.1	No sinónimo	T	I
5	15938235	C	T	Sec. codificante	AT5G39810.1	No sinónimo	R	K
5	17484480	C	T	Sec. codificante	AT5G43518.1	No sinónimo	S	L
5	18663767	C	T	Sec. codificante	AT5G46020.1	No sinónimo	G	R
5	19012403	C	T	Sec. codificante	AT5G46860.1	No sinónimo	C	Y
5	19073559	C	T	Sec. codificante	AT5G47010.1	No sinónimo	R	W
5	19283321	C	T	Sec. codificante	AT5G47540.1	No sinónimo	D	N
5	20818109	C	T	Sec. codificante	AT5G51200.1	No sinónimo	Q	*
5	22066865	C	T	Sec. codificante	AT5G54340.1	No sinónimo	S	F
5	22120057	C	T	Sec. codificante	AT5G54480.1	No sinónimo	A	V

Tabla 1. Listado de los 19 polimorfismos de nucleótido único presentes en el genoma mutante *eds4* contrastado con el genoma salvaje Col-0. (Base Ref.: Base de referencia en el genoma Col-0; Base Alt.: Base alternativa identificada en la mutante *eds4*; ID Gen: número identificador del gen; AAC Ref.: aminoácido de referencia en el genoma Col-0; AAC Alt.: aminoácido alternativo identificado en la mutante *eds4*)

Con el fin de determinar cuál de estos 19 SNPs candidatos era efectivamente el responsable del fenotipo de *eds4*, procedimos a evaluar la correlación entre la presencia de los polimorfismos y el fenotipo mutante en individuos de la población segregante (F2) originada de la retrocruza entre wt y *eds4*. La clasificación fenotípica de estos individuos fue realizada a través de la determinación del período en ensayos de movimiento de hojas, clasificando así a cada planta evaluada como salvaje (período similar al parental wt) o mutante (período largo,

similar al parental *eds4*). La identificación de la presencia (en homocigosis o heterocigosis) o la ausencia de los SNPs candidatos en cada uno de estos individuos fue realizada mediante la técnica de dCAPs (del inglés, *derived cleaved amplified polymorphic sequence*)¹⁴⁹, utilizando amplificación por PCR con primers específicos para cada polimorfismo seguido de corte con enzimas de restricción (**Tabla suplementaria 1**). Como resultado, en casi una centena de plantas evaluadas, de los 19 polimorfismos candidatos solo uno presentó una correlación completa con el fenotipo mutante de *eds4*.

El polimorfismo responsable de la mutación *eds4* se encuentra situado en el quinto cromosoma de *Arabidopsis thaliana* (posición 20818109) y consiste en una transición no sinónima (C→T) que introduce un codón de terminación prematura de la traducción (TAG) en lugar de una glutamina (CAG). Tal modificación trunca la secuencia codificante de un locus que codifica para la NUCLEOPORINA205 (*NUCLEOPORIN205*, también conocida como EMB3142, At5g51200). Esta proteína es uno de los múltiples componentes del complejo del poro nuclear (NPC, del inglés *Nuclear Pore Complex*)³³.

Para verificar la identidad de la mutante *eds4*, dos líneas mutantes por inserción de T-DNA para el gen de la NUCLEOPORINA205 (*NUP205*) fueron obtenidas del banco de semillas *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) (**Figura 5a**). De esta manera identificamos que uno de estos alelos, *nup205-1* (SALK_05559), posee un inserción de T-DNA en el exón número 13 que resulta en letalidad embrionaria cuando se encuentra en homocigosis (**Figura suplementaria 2a**). Esta observación coincide con nociones previas que determinaban a la proteína NUP205 como esencial para la viabilidad del embrión en *Arabidopsis thaliana* (de allí la anotación de NUP205 como EMB3142, del inglés *embryo-defective*)¹⁶⁶ y el hecho que su homólogo en *Saccharomyces cerevisiae* (NUP192) también resulte vital para el crecimiento de la levadura¹⁶⁷. Por otro lado, el segundo alelo obtenido (GABI_155G03, de ahora en más referido como *nup205-3*) posee la inserción hacia el extremo 3' del gen, en una posición similar o

cercana a la encontrada en *eds4*, y es viable (**Figura suplementaria 2b**). Esta característica sugiere que dicha mutante podría codificar para una versión trunca de la proteína NUP205, posicionando a la misma como una herramienta ideal para continuar con nuestro estudio.

Luego, realizamos ensayos de infección con la mutante *nup205-3* con el fin de evaluar su resistencia a patógenos. Plantas adultas de 5-6 semanas fueron infiltradas por presión con la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* ES4326. Como resultado, ensayos de determinación del crecimiento bacteriano 2 días post-infección (2 dpi) revelaron un grado de susceptibilidad significativa en la mutante *nup205-3*, con niveles similares a aquellos detectados en la mutante *eds4* (**Figura 5b**). Luego, se procedió a evaluar los ritmos circadianos en esta mutante a través de ensayos de movimiento de hojas. Nuevamente el fenotipo del alelo *nup205-3* se asemejó al de *eds4*, presentando este también un período largo (**Figura 5c**).

A continuación, dada la similitud en los fenotipos observados, procedimos a realizar ensayos de complementación cuantitativa mediante la cruce de *eds4* y *nup205-3*. Como resultado, cuando evaluamos la función circadiana en la primera generación producto de la cruce (F1), en ninguno de los múltiples cruzamientos realizados se restituyó el fenotipo salvaje (**Figura 5c** y **Figura suplementaria 2c**), lo cual solo puede ser explicado si ambas mutaciones se encuentran en el mismo gen. De esta manera logramos confirmar la idea que la mutación *eds4* se encuentra efectivamente localizada en el locus que codifica para la NUCLEOPORINA 205, miembro del complejo del nucleoporo.

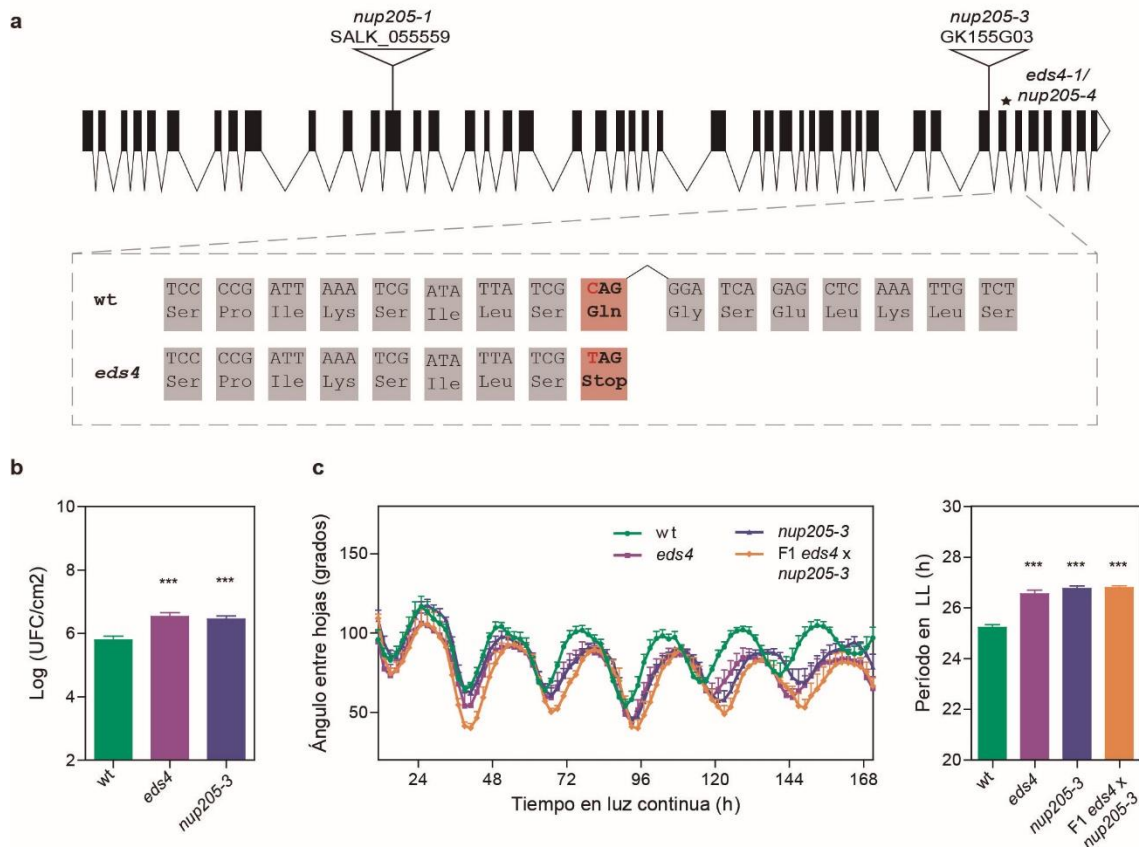


Figura 5. La mutante *eds4* posee una mutación puntual en NUP205, uno de los miembros del complejo del poro nuclear. (a) Representación esquemática de las mutaciones *eds4/nup205* a lo largo del locus *NUP205*. Cajas negras representa exones y líneas negras intrones. La mutación puntual *eds4* se encuentra señalada con un asterisco y los sitios de inserción de T-DNA de los otros alelos mutantes están representados como triángulos. La mutación *eds4* introduce un polimorfismo de nucleótido único que inserta un codón de terminación prematura de la traducción (TAG), en lugar de una glutamina (CAG). **(b)** Plantas de 5-6 semanas crecidas en condiciones de día corto fueron infectadas por infiltración con *Psm* ES4326. El crecimiento bacteriano fue evaluado 2 días post-infección (2 dpi). UFC; unidades formadoras de colonias. Se representa el promedio del Log de las UFC/cm² (n=8). **(c)** Ángulo de las hojas y período asociado a sus oscilaciones, medido para el primer par de hojas verdaderas en plántulas *wt*, *eds4*, *nup205-3* y plantas F1 obtenidas de la cruce de *mutantes eds4* y *nup205-3*, entrenadas en condiciones de LD y luego transferidas a luz continua (n=5). Estos experimentos fueron repetidos al menos tres veces con resultados similares. Las barras de error representan el s.e.m. ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

Regulación circadiana del complejo del poro nuclear

NUP205 es una de las múltiples nucleoporinas que constituyen el complejo del poro nuclear (NPC). Estas pueden ser agrupadas en 5 clases diferentes: anillo transmembrana, andamiaje central (conformado por el anillo interno, el anillo externo y nucleoporinas *linker*), filamentos citoplasmáticos, canasta nuclear y Nups que contienen repeticiones de fenilalanina y glicina (FG)³³. NUP205 forma parte del sub-complejo del anillo interno (previamente conocido como el sub-complejo de Nup93)^{33,168} localizado en la porción central del poro junto a NUP155, NUP188, NUP35, y la recientemente descrita nucleoporina CPR5^{33,35,168}.

Al analizar datos públicos de micro-arreglos¹⁵² encontramos que la mayoría de los transcritos de genes que codifican para componentes del NPC presentan oscilaciones diurnas, y que la expresión de los componentes individuales de la mayoría de los sub-complejos se encuentra fuertemente sincronizada (**Figura 6a y c**). Es más, los niveles de transcripción de los componentes del anillo central NUP205 y CPR5, pero no los de otros NUPs, muestran perfiles de expresión consistentes con una regulación del tipo circadiana en condiciones de luz continua (**Figura 6b y d**).

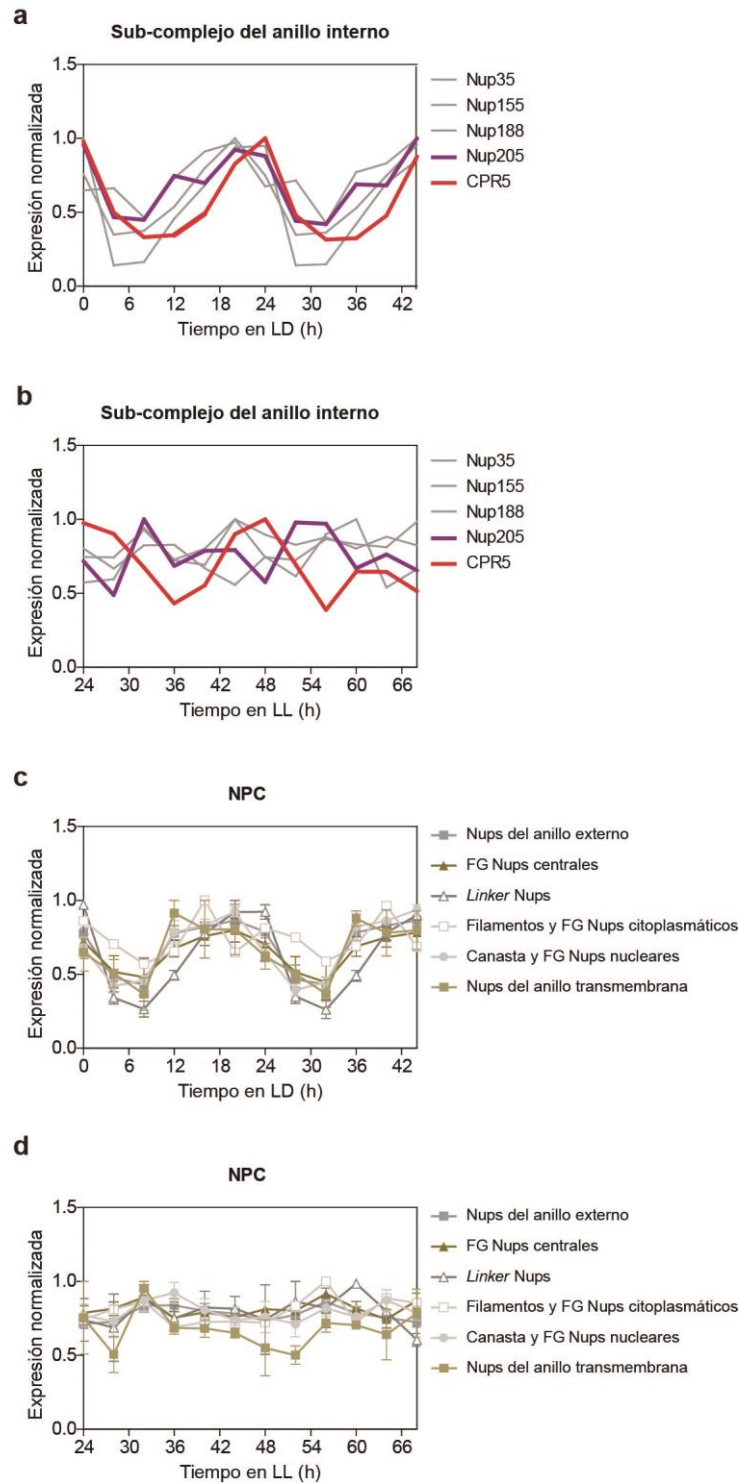


Figura 6. Expresión diurna y circadiana de los miembros del complejo del poro nuclear (NPC). Expresión normalizada de los genes que codifican para las nucleoporinas del NPC (Nups), de acuerdo a los datos de microarreglos del Mockler Diurnal¹⁵². (**a** y **b**) Expresión normalizada de genes codificante para nups del anillo interno bajo condiciones de día largo (**a**) o luz continua (**b**). (**c** y **d**) Expresión promedio de los sub-complejos del NPC bajo condiciones de día largo (**c**) o luz continua (**d**).

Caracterización transcripcional de *eds4*

Defectos circadianos para mutantes de otros sub-complejos del NPC han sido previamente reportados en *Arabidopsis thaliana* y la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*^{42,169}. Mutantes *nup* de *Arabidopsis* han mostrado alteraciones simultáneas en respuesta inmune, señalización de hormonas y luz, tiempo a floración y función circadiana^{35,170}. Tal pleiotropía de efectos podría ser simplemente explicada por alteraciones globales en el transporte de la mayoría de los mensajeros de ARN y/o proteínas, que luego podrían impactar indirectamente en múltiples procesos biológicos. Alternativamente, algunos de los fenotipos presentados por las mutantes *nup* podrían ser consecuencia directa de la alteración en el transporte nucleo-citoplasmático de un subgrupo específico de ARNm y/o proteínas.

Para comenzar a explorar estas posibilidades, analizamos el transcriptoma de plántulas de 10 días crecidas en luz continua mediante secuenciación global de ARNm (RNA-seq). Este análisis reveló un total de 492 genes diferencialmente expresados (GDE) en *eds4*, en comparación con plantas wt (**Información suplementaria 1**). Un análisis de ontologías de este grupo de GDE mostró un enriquecimiento significativo en la categoría de importación de proteínas entre los genes de expresión aumentada y principalmente categorías relacionadas a la fotosíntesis, respuesta a hormonas y estímulos lumínicos para los genes de expresión reducida (**Figura 7a** e **Información suplementaria 2**).

Llamativamente, casi todos los genes del oscilador central del reloj y muchos de los genes auxiliares del reloj, se encontraron diferencialmente expresados en la mutante *eds4* con respecto al wt (**Figura 8a** y **Figura suplementaria 3**). Enriquecimiento que, de acuerdo al test hipergeométrico, resulta mucho mayor al esperado tan solo por azar, teniendo en cuenta la cantidad de genes de reloj presentes en el genoma de *Arabidopsis* y el total de genes con expresión diferencial en *eds4*.

Estudios previos han revelado que las mutantes *nup* presentan defectos globales en la exportación de ARNm desde el núcleo,

aunque aún no se ha podido determinar si existen subgrupos específicos de ARNm que se acumulen en los núcleos de estas plantas^{36,42,171}. Con el fin de explorar esta opción, en el presente trabajo utilizamos RNA-seq para comparar la acumulación nuclear vs total de mensajeros individuales en nuestra mutante *nup*. De esta manera identificamos, en promedio, un aumento del 22% en *eds4* comparado con wt para la relación nuclear/total de mensajeros del genoma global (**Figura 7c**). Este valor es bastante similar a un aumento del 25%, aproximadamente, en la acumulación nuclear de ARNm reportado previamente para las mutantes *nup160*, *nup85* y *seh1*¹⁷¹.

De manera similar a lo observado para los genes diferencialmente expresados, aquellos transcritos que mostraron un aumento en la acumulación nuclear en la mutante *eds4*, también se encuentran enriquecidos en categorías asociadas al reloj (**Información suplementaria 3**). De hecho, la relación nuclear/total promedio estimada para los mensajeros de los genes del oscilador central fue un 300% mayor en *eds4* con respecto al wt, un efecto mucho mayor a cualquier otro observado en las categorías funcionales evaluadas (**Figura 7b-c** y **Figura suplementaria 4**). En conjunto, estos resultados prueban por primera vez la existencia de diferencias en la acumulación de un subgrupo específico de ARN mensajeros en una mutante *nup* comparado con plantas wt, efecto que impacta particularmente a los ARNm de los genes centrales del reloj.

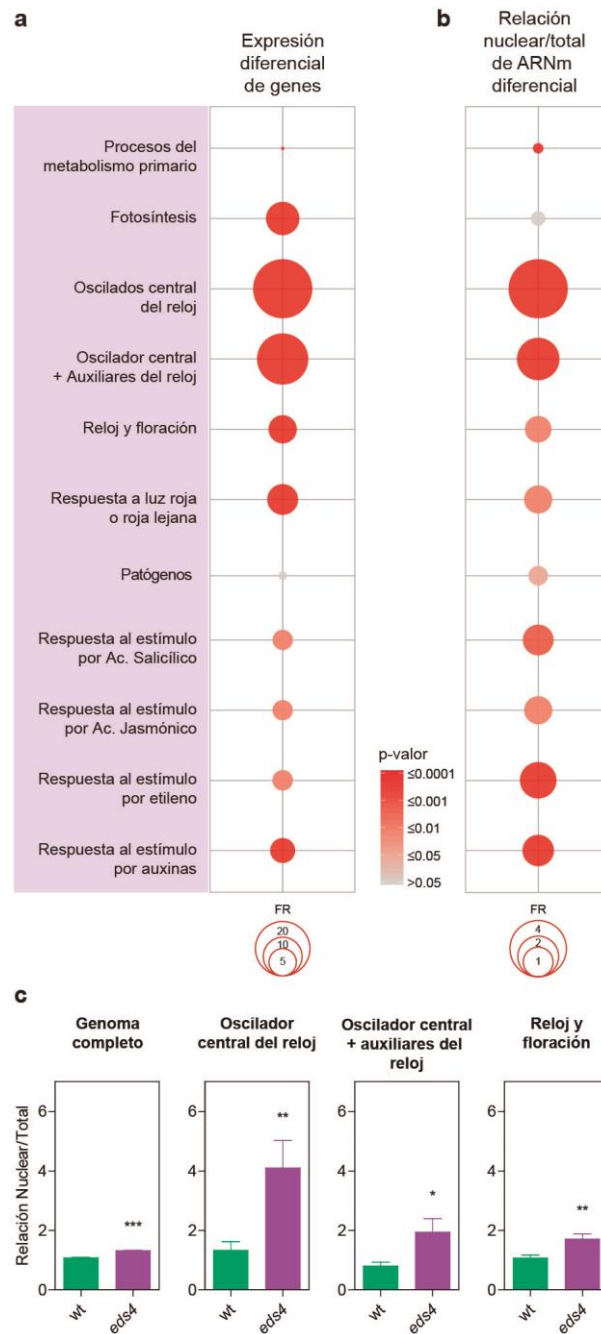


Figura 7. Impacto de EDS4 en la expresión génica y en la distribución núcleo-citoplasmática de transcritos. Factor de representación para ontologías génicas y categorías funcionales de genes con expresión diferencial ($\text{Log}_2\text{FC} > |0.58|$, $\text{FDR} < 0.1$) **(a)** o transcritos con niveles de relación nuclear/total diferenciales **(b)** en la mutante *eds4* comparada con *wt*. **(c)** Promedio de la relación de abundancia entre transcritos con ubicación nuclear y transcritos con ubicación nuclear más citoplasmática (total), para el genoma completo, oscilador central del reloj, oscilador central más genes auxiliares del reloj y genes relacionados al reloj y la floración. Las barras de error indican el s.e.m. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Prueba t de Student).

Análisis del efecto del estrés biótico sobre el reloj circadiano

Se ha demostrado que tanto infecciones bacterianas como tratamientos con Ácido salicílico son capaces de afectar la expresión de genes centrales del reloj luego de varias horas de tratamiento^{138,142}. Sin embargo, la posibilidad de que la interacción planta-patógeno desencadene cambios inmediatos y agudos en la expresión de genes del reloj, así como los mecanismos involucrados, aún no han sido exploradas. En consecuencia, analizamos información pública disponible de datos de RNA-seq provenientes de plantas salvajes de *Arabidopsis* infectadas con la cepa virulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000¹⁷². Estos datos habían sido generados por un grupo que estaba particularmente interesado en estudiar los efectos de la infección bacteriana sobre la regulación del *splicing alternativo* de genes de las plantas, por lo que la información sobre el efecto general en la expresión génica no fue estudiada en detalle en ese trabajo, aunque la información estaba disponible como material suplementario. En efecto, estudiando la información suplementaria de dicho trabajo, pudimos identificar un enriquecimiento masivo en genes centrales y auxiliares del reloj entre aquellos diferencialmente expresados tan solo 1 hora post infección (1hpi) (**Figura 8a e Información suplementaria 4**).

Observamos que la infección bacteriana gatilla en plantas wt una disminución significativa en el nivel de expresión de la mayoría de los genes centrales del reloj, incluidos los cuatro miembros de la familia génica LNK, y aumenta la expresión de algunos de los genes de la tarde (**Figura 8b**). Llamativamente, este patrón de expresión génica se asemeja fuertemente al observado en la mutante *eds4* en condiciones no infectivas (es decir, plantas *eds4* que no han sido expuestas a patógenos de plantas) (**Figura 8a y b**).

Para evaluar el efecto de la infección con patógenos sobre la expresión génica del reloj en las mutantes *eds4*, infectamos plantas wt y *eds4* de 5-6 semanas con una solución control (MgSO₄ 10 mM) o una suspensión bacteriana de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Mediciones de los niveles de expresión de genes 1hpi

mediante PCR cuantitativa (qPCR) confirmaron que la familia génica *LNK* completa se encontraba sub-expresada, así como otros genes de expresión de la mañana como *CCA1*, mientras que algunos genes de expresión de la tarde como *PRR5*, pero no *TOC1*, se encontraban sobre-expresados en las plantas wt post infección (**Figura 8c** y **Figura suplementaria 5**). Interesantemente, el efecto de la infección bacteriana sobre genes centrales del reloj se vio atenuado en las plantas mutantes *eds4*, lo cual pareciera sugerir que el NPC estaría mediando este fenómeno (**Figura 8c**).

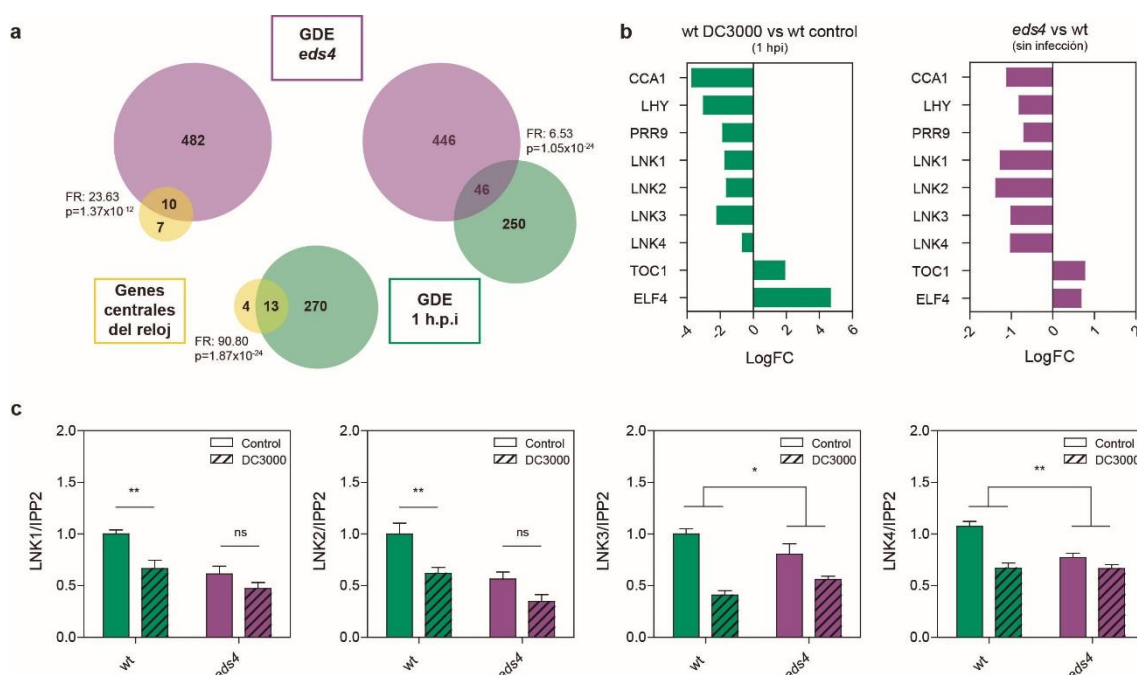


Figura 8. Efecto a corto plazo de la infección bacteriana sobre la expresión de genes centrales del reloj en plantas salvajes y mutantes *eds4*. (a) Superposición de genes diferencialmente expresados (GDE) en la mutante *eds4* en condiciones no infectivas (GDE *eds4*), genes diferencialmente expresados en plantas wt 1 hora post infección (1 hpi) con *P. syringae* DC3000 (GDE 1 hpi) ($\text{Log}_2\text{FC} > |0,58|$ and $\text{FDR} \leq 0,1$) y genes del oscilador central del reloj. La significancia del factor de representación (FR) fue evaluada a través de una prueba hipergeométrica ($p \leq 0,05$). (b) Perfil de expresión diferencial para genes del reloj: en plantas wt 1 hpi con *P. syringae* DC3000 comparadas con plantas wt control (panel izquierdo) y en plantas mutantes *eds4* comparadas con plantas wt, ambas en condiciones no infectivas (panel derecho). (c) Niveles de expresión relativos de *LNK1*, *LNK2*, *LNK3* y *LNK4*, medidos por RT-qPCR. El análisis fue realizado en plantas wt y *eds4* crecidas en SD, 1 hora posterior a la infiltración (en ZT=2) con una solución control (MgSO_4 10 mM) o una suspensión bacteriana (DC3000, $\text{OD}_{600}=0.002$) ($n=8$). Las barras de error indican s.e.m. Los

asteriscos por encima de las barras indican la significancia de la diferencia entre plantas tratadas con el control vs plantas del mismo genotipo infectadas. Los asteriscos entre genotipos indican interacción significativa entre tratamiento y genotipo; ns, no significativo, *P < 0.05; **P < 0.01 (ANOVA de dos vías seguido de pruebas de Bonferroni).

La identificación de una marcada desregulación en la expresión de los cuatro genes *LNK* 1 hora post infección bacteriana, sumado a la ya detectada disminución de sus transcritos en la mutante susceptible *eds4*, nos llevó a preguntarnos la implicancia de esta familia génica en los mecanismos de defensa.

Estudio del rol de la familia génica NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (LNK) en la relación reloj-defensa

Alteraciones en la resistencia a infecciones han sido reportadas en plantas mutantes para genes del reloj con función represora. No obstante, aún no es sabido si y cómo, activadores transcripcionales del reloj, como los genes *LNK*, son capaces de modular las interacciones planta-patógeno.

Esta familia génica fue originalmente identificada en nuestro laboratorio. Es así que trabajos previos en nuestro grupo de trabajo han descrito diversos fenotipos relacionados al reloj circadiano y las respuestas a estímulos lumínicos en la doble mutante *lnk1;2*²⁸. Recientemente, con la finalidad de estudiar el grado de redundancia presente en esta familia se ha logrado obtener la cuádruple mutante *lnk1;2;3;4* (*lnkQ*) a partir de la cruce de mutantes simples por inserción de T-DNA.

Por medio de la caracterización de la cuádruple mutante *lnk1;2;3;4* (*lnkQ*), y en menor medida de las dobles mutantes *lnk1;2* y *lnk3;4*, encontramos que las mismas resultaron ser mucho más susceptibles frente a la infección con *Pseudomonas syringae* ES4326, exhibiendo un incremento en el crecimiento bacteriano respecto al observado en las plantas wt (**Figura 9a**), que fue comparable al detectado en la mutante *eds4*.

El grado de susceptibilidad presentado por la doble mutante *lnk1;2* y la cuádruple *lnkQ*, paraleliza en gran medida con el fenotipo circadiano de estas mutantes (**Figura 9b**), sugiriendo

que las alteraciones en la función circadiana podrían ser en gran parte, aunque no necesariamente en su totalidad, las responsables de la inmunidad comprometida en las mutantes *lnk*.

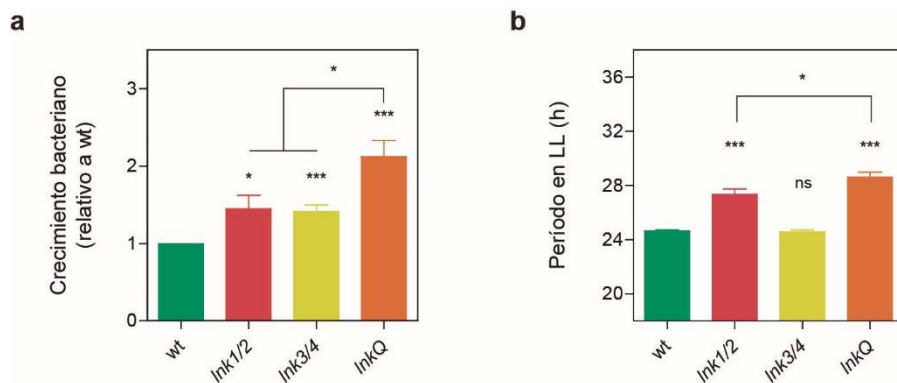


Figura 9. La familia génica *LNK* juega un rol clave en la interacción planta-patógeno. (a) Crecimiento bacteriano (relativo al wt) evaluado 2 dpi en plantas de 5-6 semanas crecidas en SD, infiltradas con *Psm* ES4326 (n=4 experimentos independientes). (b) Período de los ritmos circadianos asociados al movimiento de hojas (n=24) en plantas de 10 días wt, doble mutantes *lnk1;2* y *lnk3;4* y la cuádruple mutante *lnkQ*. Las barras de error indican s.e.m; ns, no significativo, *P < 0.05; **P < 0.01 (ANOVA de una vía seguido de prueba Tukey para comparaciones múltiples).

Con el fin de contribuir a un mayor entendimiento de las bases de la susceptibilidad frente a patógenos en las mutantes *lnk*, decidimos profundizar en la caracterización fisiológica de las mismas.

Caracterización circadiana de la familia génica *LNK*

Para comprender mejor la implicancia de la familia entera *LNK* en el funcionamiento del reloj circadiano, estudiamos algunos de los procesos principales controlados por el reloj biológico. Dado que ya había sido reportado que la doble mutante *lnk1;2* florece más tarde que las plantas wt en un fotoperíodo de día largo (LD, 16h luz; 8h oscuridad), examinamos el número de hojas al momento de floración en *lnk3;4* y *lnkQ* en distintos fotoperíodos. De esta manera identificamos que *lnk1;2* y *lnkQ*, pero no *lnk3;4*, florecen tardíamente en fotoperíodos de día largo, aunque las mutantes *lnk1;2* y *lnkQ* no presentaron diferencias significativas entre sí (**Figura 10a**). Por otro lado, ninguna de las mutantes *lnk* presentan un tiempo de floración

alterado con respecto a la planta wt en el fotoperiodo de día corto (**Figura 10b**). Estos resultados sugieren que LNK1 y LNK2, más que para el control global de la transición de estado vegetativo a reproductivo *per se*, son específicamente requeridos para la vía de floración dependiente del fotoperiodo, mientras que LNK3 y LNK4 no parecieran tener función alguna en el control de la transición floral.

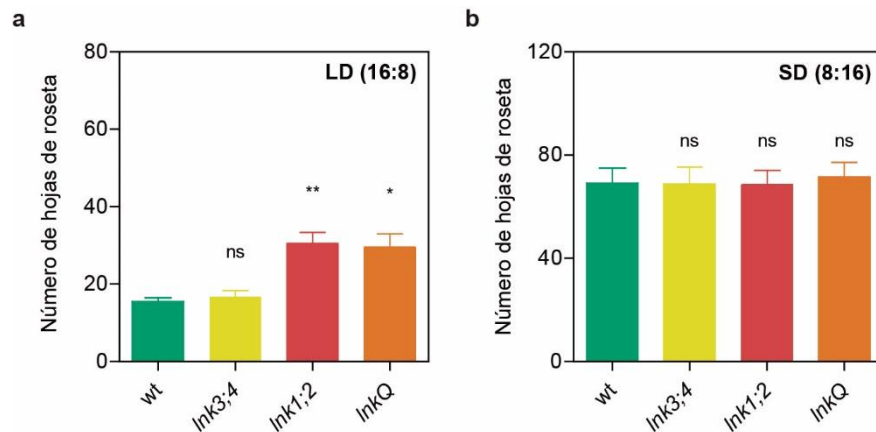


Figura 10. LNK1 y LNK2, pero no LNK3 y LNK4, tienen un rol en el control fotoperiódico de la floración. Tiempo de floración medido como el número de hojas en roseta al momento de la floración en plantas crecidas en día largo (a) y día corto (b). Las barras de error indican s.e.m. ns, no significativo; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

Además de la floración, la elongación de células del hipocotilo, un fenómeno temprano del desarrollo, es también regulado por luz y el reloj circadiano. Al estudiar la inhibición de la elongación de hipocotilos bajo diferentes tratamientos lumínicos observamos que *lnkQ*, al igual que *lnk1;2*, presentaba hipocotilos más largos bajo luz roja o azul continua, indicando hiposensibilidad en ambas longitudes de onda. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre las dobles *lnk1;2* y las cuádruples mutantes, ni entre las dobles *lnk3;4* y las plantas wt (**Figura 11 a y b**). A continuación evaluamos el efecto de diferentes fotoperiodos sobre la elongación de hipocotilos. Llamativamente, tanto *lnk1;2* como *lnkQ* mostraron hipocotilos más largos que el wt o *lnk3;4* en ambas condiciones fotoperiódicas. Una vez más no se detectaron diferencias significativas entre *lnk1;2* y *lnkQ* o entre *lnk3;4* y wt (**Figura 11 c y d**). Por último evaluamos la inhibición de la elongación en luz blanca continua.

Bajo esta condición ambas mutantes dobles, así como la cuádruple, mostraron hipocotilos significativamente más largos que el genotipo salvaje, siendo los de *lnk1;2* y *lnkQ* aún más largos que los de *lnk3;4* (**Figura 11e**). De manera colectiva, estos resultados indican que LNK1 y LNK2 poseen un rol dominante en la mediación de la inhibición por luz del crecimiento del tallo embrionario, mientras que LNK3 y LNK4 parecieran tener un rol minoritario en este proceso.

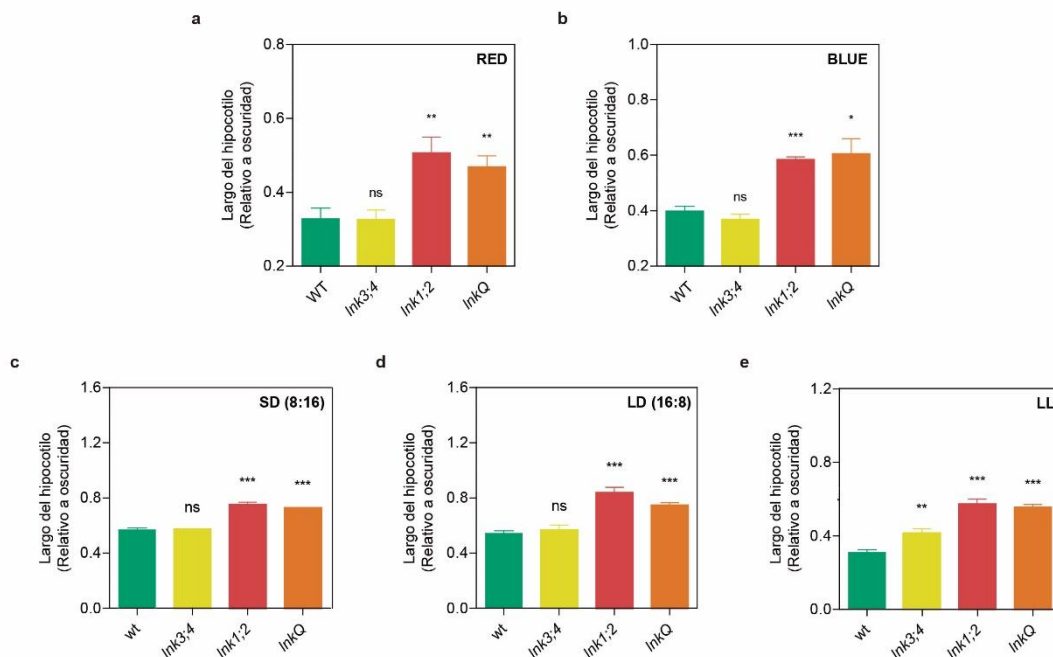


Figura 11. Rol de la familia LNK en el control de la fotomorfogénesis. Hipocotilos de plantas wt y mutantes LNK crecidas en diferentes longitudes de ondas y fotoperíodos. Los resultados se expresan relativizados al largo de cada genotipo en un control crecido en total oscuridad. (a) Luz roja continua (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). (b) Luz azul continua (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). (c) Fotoperíodo de día corto con luz blanca. (d) Fotoperíodo de día largo con luz blanca. (e) Luz blanca continua. Las barras de error representan s.e.m. ns, no significativo; *P < 0.05; **P < 0.01; ***p < 0.001 (Prueba t de Student).

En conclusión, pareciera ser que si bien la cuádruple mutante *lnkQ* presenta un período asociado al movimiento circadiano de las hojas más largo que la doble *lnk1;2*, en lo que respecta a otros procesos asociados al reloj estas no se diferencian entre sí. A su vez, el hecho que la doble mutante *lnk3;4* presente una susceptibilidad exacerbada frente a patógenos, pero no así

defectos en su función circadiana, podría sugerir la implicancia de estos genes en funciones independientes del reloj de algún modo conectados a las defensas.

A raíz de ello, nos propusimos indagar otros rasgos de las mutantes *lnk* que pudiesen influenciar sobre los mecanismos de tolerancia a estrés biótico.

Análisis del rol de la familia LNK en el desarrollo vegetal

En contraposición a la aparente similitud entre *lnk1;2* y *lnkQ* en lo que respecta a tiempo de floración y a la inhibición por luz del crecimiento del hipocotilo, estas plantas presentaron diferencias significativas en sus fenotipos de planta adulta (**Figura 12a**). Para explorar en mayor profundidad estas diferencias fenotípicas se midió el perímetro de rosetas en plantas crecidas en día corto. Tanto las rosetas de plantas *lnk1;2* como *lnkQ* presentaron un diámetro mayor a aquellas de plantas wt, siendo en este caso las del *lnkQ* significativamente mayores que las de *lnk1;2*. Por otro lado, las rosetas de *lnk3;4* no presentaron diferencias con respecto a wt (**Figura 12b**). Luego, evaluamos la producción de biomasa asociada al incremento en el tamaño de roseta y en concordancia observamos que las rosetas de *lnkQ* presentaban un aumento del 72% en el peso seco con respecto a plantas wt y un 27% con respecto a las mutantes *lnk1;2*. A su vez, la doble *lnk1;2* presentó un aumento de biomasa del 36% con respecto a la wt, mientras que una vez más la doble *lnk3;4* no presentó diferencias significativas con respecto a la wt (**Figura 12c**).

Otro rasgo del desarrollo afectado en la mutante adulta *lnkQ* es la morfología de sus hojas. Este podría ser un determinante de la diferencia en biomasa observada (**Figura 12d**). Para cuantificar esta característica, calculamos la relación largo de lámina foliar/largo total de la hoja y medimos también el largo de los pecíolos de la octava hoja en plantas crecidas en condiciones de día largo. Todas las mutantes evaluadas presentaron una relación lámina/hoja menor en relación a plantas wt (**Figura 12e**). Estos resultados podrían ser atribuidos a

diferencias en el largo de la lámina, del peciolo o de ambos. En estas condiciones lumínicas, el largo de los peciolos en *lnkQ* y *lnk1;2* fue mucho mayor al wt, y similar entre sí, indicando que las diferencias entre estas mutantes en la relación largo de lámina foliar/largo total de la hoja en condiciones de día largo es debido a láminas más pequeñas. Por otro lado, las dobles mutantes *lnk3;4* no presentaron diferencias en el largo de su peciolo con respecto al wt (**Figura 12f**). Estos resultados parecieran indicar que la familia de co-activadores LNK controlaría redundantemente el crecimiento de peciolos y hoja, lo cual en consecuencia impacta en el tamaño de rosetas y la acumulación de biomasa en la planta adulta principalmente en los peciolos.

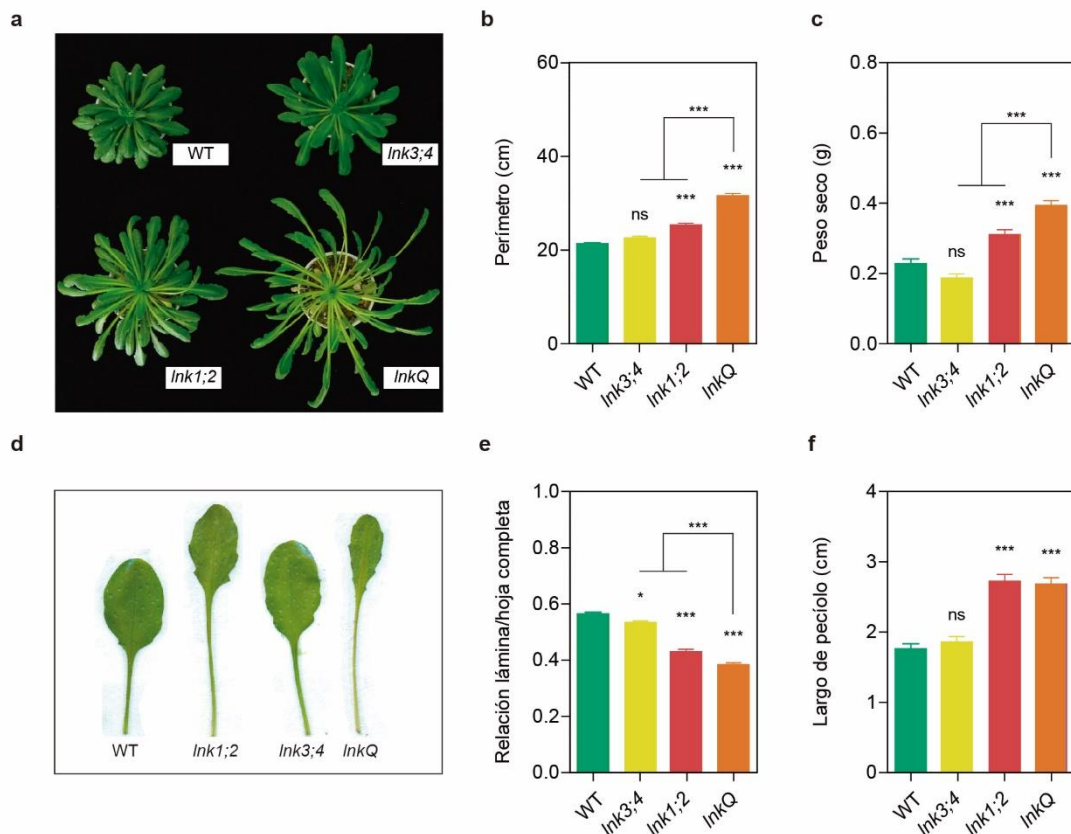


Figura 12. Los miembros de la familia LNK actúan como reguladores del crecimiento. Para evaluar el rol de la familia LNK en el control del crecimiento en el estado vegetativo, rasgos morfológicos fueron medidos en condiciones de crecimiento de día corto. **(a)** Fenotipo de la roseta en plantas de 10 semanas wt y mutantes *lnk*. **(b)** Perímetro de la roseta medido luego de la transición a la floración. **(c)** Peso seco en plantas adultas de 10

semanas con escapos florales removidos. Para la caracterización de la morfología de hoja, las plantas fueron crecidas en día largo y en un estadio de crecimiento de 12 hojas, la hoja número 8 fue cortada y medida. (d) Octava hoja representativa para plantas wt y mutantes *lnk*. (e) Relación lámina/hoja completa. (f) Largo del pecíolo en cm. Barras de error representan s.e.m. ns, no significativo; *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

Dado que la mayor biomasa de roseta observada en *lnk1;2* y *lnkQ* estaría relacionada a la morfología de las hojas, nos propusimos estudiar con mayor detalle el desarrollo de las hojas de dichas mutantes. Otra característica observable en la cuádruple mutante LNK es la orientación que adoptan sus hojas en relación a la fuente lumínica. Este proceso, conocido como respuesta fototrópica o fototropismo, es una de las respuestas de crecimiento adaptativo más reconocibles en plantas y es generada por una elongación diferencial de las células, que resulta en la orientación de los diferentes órganos hacia una fuente lumínica, con la finalidad de optimizar la captura de luz fotosintética. El mismo es inducido por longitudes de onda UV y azul (290-500 nm) y modulado en parte por luz roja.

Mientras que plantas wt o mutantes *lnk3;4* presentan rosetas planas con ángulos entre hojas opuestas de 128 y 131 grados respectivamente, *lnk1;2* presenta hojas más erectas con ángulos de alrededor de 117 grados y *lnkQ* forma ángulos notoriamente agudos con sus hojas que alcanzan los 80 grados, indicando un fuerte fenotipo hiponástico en estas mutantes *lnk* (**Figura 13a**).

A continuación exploramos si el origen de este fenotipo característico se debía a una respuesta fototrópica exacerbada en las mutantes. Para ello colocamos plantas en día largo con solo una fuente lumínica lateral y registramos la reorientación de sus hojas de roseta. Cuando las plantas tuvieron entre 8 y 10 hojas, medimos la proporción de hojas cuyas láminas se orientaban perpendicularmente a la fuente de luz lateral. En plantas wt alrededor de la mitad de las lámina foliares (48%) adoptó dicha orientación, particularmente aquellas más cercanas a la fuente de luz. Llamativamente, todas las mutantes *lnk* evaluadas presentaron un aumento significativo en la proporción

de hojas reorientadas: *lnk3;4* y *lnk1;2* reorientaron el 60% y 72% de sus hojas respectivamente, mientras que en *lnkQ* el 87% de las hojas adoptó esta posición (**Figura 13b**). Para evaluar las respuestas fototrópicas en otros estadios de vida, medimos también la reorientación de hipocotilos en respuesta a una luz azul lateral, como fuese propuesto por Fankhauser et al.¹⁶⁰. No se detectaron diferencias entre wt y mutantes *lnk* en estas condiciones (**Figura suplementaria 6**), sugiriendo que estos genes modulan de manera redundante las respuestas fototrópicas principalmente en el estadio de vida adulto.

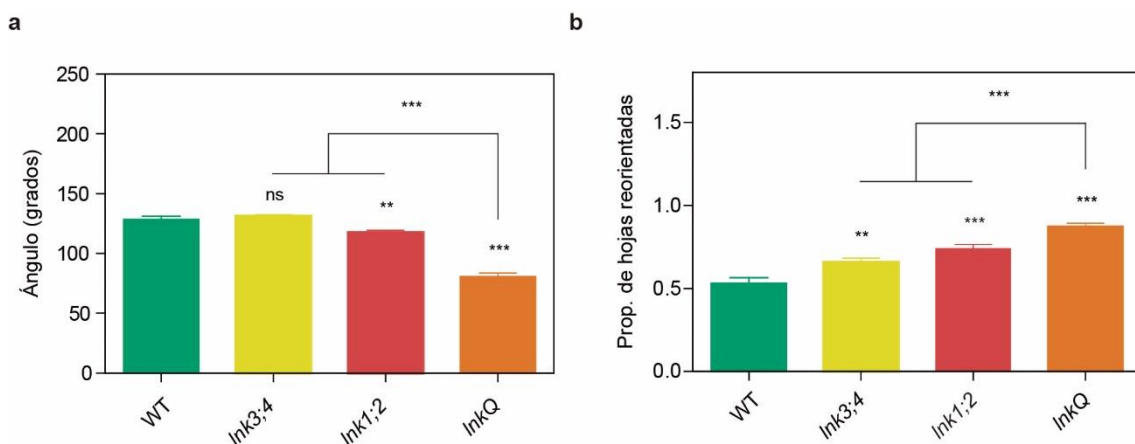


Figura 13. La cuádruple mutante *lnkQ* presenta respuesta fototrópicas exacerbadas. (a) Ángulo entre las hojas opuestas más cercanas a la fuente lumínica en plantas adultas de 6 semanas crecidas en día corto. (b) Proporción de láminas foliares orientadas a una fuente lumínica lateral en plantas crecidas en día largo. Barras de error representan s.e.m. ns, no significativo; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (Prueba t de Student).

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta caracterización de la familia génica LNK parecieran indicar que por un lado solo LNK1 y LNK2 tendrían un rol predominante en el control de la función circadiana, pero por otro lado sería la familia completa quien actúe mediando las respuestas del fototropismo. Esto llevaría a que la cuádruple mutante *lnkQ* presente respuestas fototrópicas exacerbadas que dan como resultado un incremento en el tamaño y biomasa de las plantas en su estadio vegetativo, indicando una clara desinhibición del crecimiento. Estos rasgos combinados con una marcada disfunción circadiana podrían ser en

parte responsables de la susceptibilidad acentuada de las mutantes *lnks* a patógenos.

Discusión y
conclusiones

***Enhanced Disease Susceptibility 4 (eds4)* como candidato novedoso a mediar la relación reloj-defensas**

En el marco de un objetivo global centrado en el estudio de la regulación del reloj circadiano de plantas por señales ambientales, en el presente trabajo nos enfocamos en el estudio de la influencia de factores ambientales de estrés biótico sobre el funcionamiento del reloj. Estas vías de señalización componen uno de los tantos mecanismos de regulación que influyen sobre el oscilador central y hasta la fecha poco se conoce sobre su mecanismo de acción.

Basándonos en nociones previas que posicionan al sistema inmune de plantas como uno de los diversos *outputs* gobernados por una regulación de tipo circadiana y partiendo de una hipótesis inicial que planteaba la posibilidad de mecanismos y actores comunes entre las vías de señalización del reloj y la respuesta inmune, decidimos indagar sobre la función circadiana en mutantes para genes tradicionalmente asociados a respuestas de estrés biótico.

Esta aproximación nos permitió identificar defectos en las respuestas a estímulos lumínicos y procesos regulados por el reloj biológico en una mutante asociada a los mecanismos de defensa: *Enhanced Disease Susceptibility 4 (eds4)*. Nuestro análisis fisiológico y molecular de las alteraciones presentes en la mutante de *Arabidopsis eds4* muestra que en adición a su ya reportado fenotipo de susceptibilidad a patógenos bacterianos, *eds4* presenta también alteraciones en su función circadiana. Estas resultan evidenciables a nivel de planta entera, como en el movimiento de su primer par de hojas o la elongación rítmica de hipocotilos en ciclos alternados de luz blanca y oscuridad y a nivel de la expresión de genes, detectable a través del monitoreo de líneas transgénicas con reporteros para genes centrales del reloj. Estos defectos son acompañados también por deficiencias en las respuestas a señales lumínicas que generan una hiposensibilidad en la elongación de hipocotilos en condiciones de luz continua roja y otros procesos del

desarrollo, como una transición acelerada al estadio reproductivo.

Develando el misterio de *eds4*

Más de dos décadas han transcurrido desde que la mutante *eds4* fuera identificada por primera vez en una población mutagenizada de *Arabidopsis thaliana*, en un estudio en busca de mutantes susceptibles a la infección con el patógeno bacteriano virulento *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 (Psm ES4326)¹⁶². Desde entonces, algunos estudios han identificado que la mutación presente en *eds4* es de naturaleza recesiva y han sugerido un rol para *EDS4* en las vías de señalización dependientes de ácido salicílico (AS), que conducen a la acumulación del mismo y a la activación de genes de respuesta a patógenos^{165,173}. No obstante, esfuerzos por ubicar a *EDS4* en el mapa génico han fallado debido a la obtención de patrones de segregación poco claros al intentar cruzar la mutante, aislada originalmente en el ecotipo Columbia-0 (Col-0), con plantas salvajes de ecotipos divergentes¹⁶⁵.

Teniendo en cuenta estas dificultades encontradas en el pasado al intentar aplicar estrategias de mapeo tradicionales, en este trabajo abordamos una estrategia diferente. Dado que una re-secuenciación de genoma completo ya había sido aplicada con éxito para el mapeo de una mutación novedosa del reloj en el genoma de *Arabidopsis*¹⁷⁴, optamos por la aplicación de esta estrategia para desentrañar las bases génicas de la mutante *eds4*. Fue así que el genoma completo de la mutante *eds4* fue re-secuenciado. Al contrastar las secuencias obtenidas con el genoma de una planta salvaje del mismo ecotipo (Col-0, también re-secuenciada) identificamos 19 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) distribuidos en dos regiones cromosómicas pertenecientes al cromosoma 1 y 5 de *Arabidopsis*. Al evaluar la co-segregación de estos 19 polimorfismos con el fenotipo mutante *eds4* en una población F2, producto de la retrocruza *eds4* x Col-0, identificamos que solo uno de ellos presentaba una correlación del 100% con el período largo asociado a *eds4*.

Finalmente, ensayos de complementación cuantitativa nos permitieron inequívocamente posicionar al gen *EDS4* en el cromosoma número 5 de *Arabidopsis thaliana*, situado en un locus que codifica para la NUCELOPORINA205 (NUP205), uno de los miembros del anillo interno del complejo del poro nuclear de *Arabidopsis*.

El complejo del núcleo-poro y su rol en las funciones circadianas y de defensa

El complejo del poro nuclear (NPC, del inglés nuclear pore complex) es un gran complejo multi-proteico que penetra la envoltura nuclear, conectando núcleo y citoplasma. Siendo que estos poros distribuidos a lo largo de la membrana del núcleo representan la única puerta de entrada (y salida) del mismo, se considera al NPC un actor principal en la regulación del transporte núcleo-citoplasmático de mensajeros del ARN y proteínas¹⁷⁵. Sumado a ello, evidencia reciente pareciera mostrar que el NPC juega además otros roles relevantes que incluyen regulación de la expresión, organización de la cromatina, reparación del ADN, procesamiento del ARN y control de su calidad, y control del ciclo celular en múltiples organismos eucariotas¹⁷⁶.

A pesar que análisis estructurales del NPC revelan una estructura básica conservada entre vertebrados¹⁷⁷, levaduras¹⁷⁸ y plantas^{179,180}, pareciera ser que el NPC de plantas se encuentra más cercano al NPC de metazoos que al de levaduras¹⁶⁸.

Los componentes del poro nuclear son proteínas denominados nucleoporinas (NUPs) que cumplen diversos roles en el control del desarrollo y la fisiología de plantas¹⁷¹. En consecuencia, no resulta sorprendente que muchas mutantes nulas para nucleoporinas fueran identificadas por exhibir letalidad embrionaria en *Arabidopsis*. Tal es el caso de MOS7/NUP88³⁴, NUP214/LNO1¹⁸¹, GLE1¹⁸¹, NUP1/NUP136¹⁸², NUP62¹⁶⁶ y NLP1/CG¹⁷¹. Este es el caso también de otros alelos mutantes de NUP205, previamente identificados como letales^{166,171}.

Dado que la mutación puntual identificada para *eds4* en este trabajo se trata de una transición no sinónima (C→T) que introduce un codón de terminación prematura de la traducción (TAG) en lugar de una glutamina (CAG) hacia el extremo 3' de un locus considerablemente extenso (14915pb), es probable que el fenotipo de la mutante *eds4* sea resultado de una versión trunca de la proteína NUP205 que afecta la función nativa de la nucleoporina en el NPC, pero mantiene algo de su funcionalidad.

Dentro de las mutantes *nup* viables identificadas, se han detectado defectos más bien pleiotrópicos en su desarrollo, abarcando múltiples vías de señalización. El aumento en la susceptibilidad ante una infección por patógenos por el cual la mutante *eds4* fue aislada en primera instancia resulta un rasgo común entre mutantes para componentes del NPC. Es así que mutantes para las nucleoporinas MOS3/NUP96, MOS7/NUP88, SAR1/NUP160 y Seh1 presentan defectos en su inmunidad basal cuando son infectadas con cepas virulentas de *Pseudomonas syringae*^{34,36,37}. En oposición, otras mutantes para NUP54, NUP136 y una de las más recientemente identificadas *nups*, CPR5, presentan una respuesta aún más fuerte en lo que respecta a la inmunidad gatillada por efectores bacterianos (ETI) cuando son desafiadas con cepas avirulentas de *Pseudomonas*³⁵. Tomados en su conjunto, estos resultados señalan que los miembros del NPC tienen un efecto significativo en diversas respuestas a patógenos.

Sumado a los defectos en las respuestas de estrés biótico ya identificadas para *eds4*, en el presente trabajo presentamos una caracterización novedosa de la mutante en lo que respecta a respuestas a la luz y función circadiana. La hiposensibilidad detectada en la elongación de hipocotilos en respuesta a luz roja, pero no azul, sugiere alteraciones en las vías de señalización específicas para esta longitud de onda. No obstante, el hecho que la diferencia entre hipocotilos de plantas wt Col-0 vs plantas mutantes se acrecienta en ambientes con luz blanca cíclica (como día largo o corto), en oposición a la condición de luz blanca continua, señala un defecto en el

funcionamiento circadiano de la mutante, más allá de las vías de señalización de la luz. La floración temprana detectada para la mutante *eds4*, concuerda con esta idea. Esta aceleración en la transición a la etapa reproductiva es también un fenotipo común en múltiples mutantes *nups* y ha sido ampliamente estudiado en componentes como MOS3/NUP96, SAR1/NUP160, Elys/HOS1, NUP62, TPR1/NUA y NUP136/NUP1^{39,40,43,168,183,184}. En oposición, la conexión entre reloj circadiano y NPC ha sido muy poco explorada. *eds4* presenta fenotipo de período largo, tanto en el movimiento de sus hojas como en el perfil de expresión de genes centrales del reloj. En un único estudio previo se había reportado que la mutante para HOS1, junto a SAR1/NUP160, Tpr/NUA y NUP107 presentan alteraciones en la periodicidad circadiana que resultan también en un enlentecimiento de su reloj⁴².

Nuestro análisis de expresión global reveló un enriquecimiento significativo en componentes centrales del reloj y proteínas auxiliares del reloj para aquellos genes diferencialmente expresados en la mutante *eds4*. Resulta interesante que el enriquecimiento en estas categorías fuese por mucho mayor al de cualquier otra categoría, incluso aquellas relacionadas a defensas. Estos resultados sugieren que la susceptibilidad aumentada en *eds4* podría deberse a una desregulación completa de genes centrales del reloj más que de genes asociados a respuesta frente a patógenos.

En miembros del NPC, los defectos metabólicos y fisiológicos, e incluso la desregulación de la transcripción, han sido asociados a defectos en la exportación de mensajeros de ARN desde el núcleo, a partir de resultados obtenidos en ensayos de hibridación *in situ* de mensajeros^{36,42,171}. En este trabajo hemos realizado, por primera vez en el campo del estudio del NPC, una secuenciación global de ARN proveniente únicamente de núcleos (NUCLEAR) vs ARN de célula completa (TOTAL). De esta manera identificamos un aumento del 22% en la relación NUCLEAR/TOTAL promedio para el genoma completo en *eds4* vs plantas wt, lo cual confirmó una retención global leve de transcriptos en la mutante. Este resultado es similar a la acumulación de

mensajeros de ARN cercana al 25% calculada a partir de mediciones de fluorescencia en los ensayos de hibridación *in situ* realizados con mutantes *nup160*, *nup85* y *seh1*¹⁷¹.

Sorprendentemente, el análisis de las ontologías génicas y categorías funcionales enriquecidas en los transcritos diferencialmente retenidos en la mutante *eds4*, revelaron una vez más una sobre-representación de categorías asociadas al reloj circadiano. Es más, cuando la relación NUCLEAR/TOTAL promedio fue estimada para los genes centrales del reloj únicamente, la acumulación de estos transcritos en la mutante fue de un 300% en comparación con la wt. Una relación por lejos mayor a la detectada en las otras categorías de genes con mensajeros diferencialmente retenidos. De esta manera, el conjunto de resultados aquí mostrados, presentan por primera vez una retención específica de mensajeros de componentes circadianos en una mutante de nucleoporina, reforzando nuestra idea que propone a la función circadiana alterada de *eds4* como responsable principal de su fenotipo mutante.

Otro aspecto interesante detectado en este trabajo es que todos los sub-complejos del NPC presentan una expresión concertada en condiciones ambientales cíclicas. Sumado a ello, la expresión de NUP205 y otra de las nucleoporinas del sub-complejo al que NUP205 pertenece, CPR5, se encuentra bajo regulación circadiana en condiciones de libre curso. Con esto en mente, consideramos que futuras investigaciones que exploren la relación entre el reloj circadiano, las respuestas a patógenos y el NPC podrían echar luz sobre la relevancia de este sub-complejo como un nodo importante de comunicación entre las señales ambientales externas y la regulación circadiana del estado interno de la planta.

Efectos de la infección por patógenos sobre el reloj circadiano

El perfil de expresión diferencial de genes centrales del reloj identificado para plántulas de *eds4* en condiciones no infectivas de luz blanca continua se asemeja a aquel previamente publicado en un estudio de secuenciación realizado con plantas salvajes de

Arabidopsis thaliana 1 hora posterior a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*¹⁷². En este se puede observar una disminución en la expresión de genes de la mañana, como CCA1, LHY y PRR9, y de genes que se expresan a media-mañana, como la familia génica LNK (LNK1, LNK2, LNK3 y LNK4). En oposición, se observa también un incremento en la expresión de genes de expresión por la tarde-noche como TOC1 y ELF4. Si bien el grado de desregulación resulta más leve, estos resultados sugieren que en lo que respecta a la expresión de genes centrales del reloj, la mutante *eds4* presenta un estado constitutivo que asemeja aquel detectable en plantas salvajes al poco tiempo de una infección con bacterias virulentas.

Poco se conoce hasta la fecha en lo que respecta a la regulación recíproca entre el reloj circadiano de *Arabidopsis* y las vías de defensa que se activan frente a la infección bacteriana. Trabajos recientes en el área señalan que tanto una infección localizada con *Pseudomonas*, como el tratamiento con la hormona de defensa, ácido salicílico (AS), son capaces de modificar la amplitud y expresión promedio de genes centrales del reloj, unas cuantas horas luego del tratamiento. No obstante, existen discrepancias en cuanto al efecto de estos tratamientos sobre la regulación del reloj circadiano. Mientras que una exposición prolongada a AS aumenta la amplitud en la expresión y expresión promedio de genes de la noche, como TOC1 y de genes de la mañana, como LHY¹³⁸, tratamientos transitorios con AS o una infección bacteriana con la cepa DC3000 atenúan los ritmos de CCA1/LHY así como de TOC1¹⁴².

En este trabajo presentamos resultados que muestran una desregulación significativa de genes centrales del reloj de *Arabidopsis thaliana* tan solo una hora luego del tratamiento con la bacteria virulenta *Pseudomona syringae* DC3000. Mientras que los niveles de ARNm de CCA1, LNK1, LNK2, LNK3 y LNK4 presentaron reducciones significativas, los niveles de PRR5 mostraron un incremento luego de la infección bacteriana en plantas wt.

En trabajos previos donde genes de la mañana así como genes de la tarde resultaban sobre-expresados luego de una señal de infección, los autores hipotetizaron que estos cambios en la expresión de genes del reloj podían servir para reforzar el funcionamiento del mismo, con el objetivo de fortalecer las respuestas inmunes por la mañana sin descuidar el crecimiento por la noche, evitando así que los mecanismos de defensa consumieran todos los recursos energéticos¹³⁸. En contraposición, en aquellos trabajos donde la señal de infección resultó en una sub-expresión de genes del reloj (tanto de mañana como de noche), los autores sugirieron que este "debilitamiento" del reloj podría ser necesario para prolongar la inmunidad y así prevenir futuras re-infecciones¹⁴².

En contraste con estas nociones que posicionan el desajuste del reloj como una estrategia de la planta hospedera bajo ataque patogénico, el hecho que la mutante *eds4* presente un perfil de expresión de genes del reloj similar al que se observa en una planta recién infectada y aun así resulte sumamente susceptible a la infección por patógenos encuadra mejor con una idea que proponga al patógeno mismo como responsable de interferir con el funcionamiento del reloj de la planta. Los resultados aquí presentados nos hacen suponer que la perturbación o el "secuestro" del reloj circadiano por parte de la bacteria virulenta podría ser una de las tantas estrategias infectivas empleadas por la misma con el fin de asegurarse una exitosa colonización del sistema vegetal.

En paralelo, el hecho que esta reconfiguración del perfil transcripcional del reloj luego de la infección se viese atenuada en la mutante para EDS4/NUP205 nos hace suponer que el complejo del nucleoporo debe encontrarse involucrado en este proceso de desregulación. Dentro del NPC, NUP205 se encuentra ubicado en el sub-complejo del anillo interno. Otro de los componentes de este sub-complejo es CPR5, una proteína recientemente catalogada como nucleoporina³⁵. Llamativamente, se ha demostrado que ante una infección bacteriana, esta proteína es activada por receptores inmunes intracelulares sufriendo

cambios conformacionales que liberan componentes de señalización involucrados en la inmunidad gatillada por efectores (ETI) y al mismo tiempo reconfigurando la barrera selectiva del NPC, permitiendo así la entrada de moléculas de señalización al núcleo necesarios para el establecimiento de la respuesta inmune³⁵. Estos resultados nos hacen preguntarnos si pudiesen existir mecanismos similares que fuesen responsables de las modificaciones en el funcionamiento del reloj detectadas luego de la infección en plantas wt o constitutivamente presentes en la mutante *eds4*.

En consecuencia, basados en el conjunto de resultados aquí presentados, proponemos que un evento temprano en la infección patogénica sería el "secuestro" por parte de efectores bacterianos de la red de expresión génica que compone el oscilador central del reloj circadiano. Para que esta reprogramación transcripcional tenga lugar se requiere de la correcta dinámica de transporte nucleo-citoplasmático regulada por el complejo del poro nuclear, el cual se encuentra a su vez regulado por el reloj mismo. En última instancia esta disrupción de la red génica circadiana llevaría a la atenuación del sistema inmune innato, propiciando así el crecimiento bacteriano y la susceptibilidad de la planta (**Figura 13**).

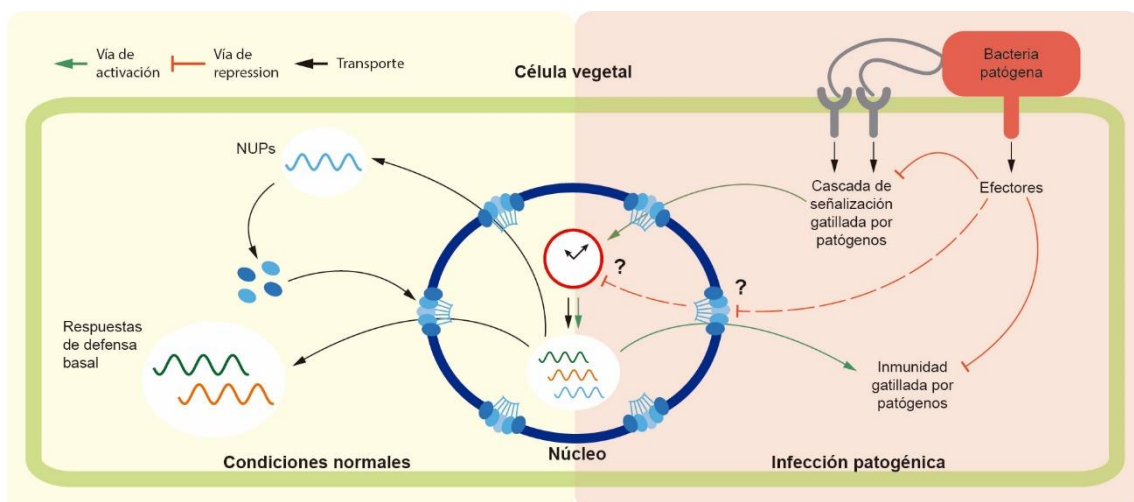


Figura 13. Representación esquemática del efecto de la infección bacteriana sobre la red de expresión génica del reloj circadiano y el sistema inmune.

La familia génica LNK y los mecanismos de defensa

El hecho de identificar una marcada disminución en la expresión de todos los integrantes de la familia génica LNK tanto en la mutante susceptible *eds4* como en la planta wt luego de la infección bacteriana, nos hizo suponer una posible implicancia de este grupo de genes en las vías de respuesta a patógenos. En consecuencia, procedimos a evaluar las defensas en las mutantes múltiples para los integrantes de la familia LNK, lo cual constituyó la primera caracterización del rol de componentes activadores del reloj circadiano en la interacción planta-patógeno. De esta manera pudimos identificar que las dobles mutantes *lnk1;2* y *lnk3;4* y aún en mayor medida, la cuádruple mutante *lnkQ* (*lnk1;2;3;4*), presentan un aumento en la susceptibilidad ante la infección con *Pseudomonas syringae* ES4326. Este resultado reveló el carácter esencial de la familia génica LNK para un correcto establecimiento de la respuesta inmune en *Arabidopsis thaliana*.

El grado de susceptibilidad identificado para las mutantes *lnk1;2* y *lnkQ* paraleliza en parte el efecto identificado para estas mutaciones sobre la función circadiana, las cuales resultan en un fenotipo de período largo para *lnk1;2* y aún más largo para *lnkQ*. Esto sugiere que alteraciones en la función circadiana podría ser responsable, al menos en parte, de la inmunidad comprometida de las mutantes *lnk*. Por otro lado, el hecho que la doble mutante *lnk3;4* presente defectos en sus defensas pero no en el funcionamiento del reloj, parece sugerir que los genes LNK se encuentran involucrados también en mecanismos independientes del reloj que pueden afectar las vías de respuesta a patógenos.

Caracterización fisiológica de la cuádruple mutante *lnkQ*

La familia de genes NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (LNK) fue previamente identificada en nuestro laboratorio y LNK1 y LNK2 caracterizados en un esfuerzo por identificar actores que conectaran las vías de señalización en respuesta a la luz y el reloj circadiano²⁸. En trabajos posteriores se identificó que

LNK1 y LNK2 no presentan dominios de unión al DNA *per se*, pero que sí cumplen un rol como co-activadores de los genes centrales del reloj TOC1 y PRR5. Esto es posible gracias a la interacción de los LNKs con los miembros de la otra familia de activadores del reloj circadiano REVEILLE (RVE)²⁹. Por otro lado, a pesar de la carencia de dominios funcionales en los miembros de la familia LNK, estos sí comparten dos regiones conservadas denominadas R1 y R2 y mutaciones en estos motivos impiden la habilidad de LNK1 de interactuar con RVE4²⁹.

En el presente trabajo presentamos una caracterización de la familia completa LNK, en la cual identificamos que los diferentes miembros presentan distintos, aunque a veces redundantes, roles en la regulación de la función circadiana, la respuesta inmune, el control del crecimiento y el fototropismo.

En contraste a lo observado en el control de los ritmos circadianos en ensayos de movimiento de hojas, donde *lnkQ* presenta un período más largo que *lnk1;2*, para otros procesos biológicos regulables por el reloj, como el tiempo de floración y la inhibición de la elongación de hipocotilos por luz, no se detectaron diferencias entre estas mutantes. Esto sugiere que LNK1 y LNK2 presentan una función que LNK3 y LNK4 no poseerían. LNK3 y LNK4 son proteínas mucho más pequeñas que LNK1 y LNK2 (30kDa y 60 kDa respectivamente). Zhou et al. probó que un dominio Extra N-terminal Tail (ENT) de unos ~300 amino ácidos, presente únicamente en LNK1 y LNK2, es necesario para la acción de estas proteínas como co-represores de genes relacionados a la biosíntesis de fenil-propanoides¹⁸⁵. De hecho, cuando este dominio ENT fue fusionado al extremo N-terminal de LNK3, la proteína quimera ENT-LNK3 se comportó como LNK1. En consecuencia, LNK1 y LNK2 resultan ser proteínas más complejas, mientras que LNK3 y LNK4 probablemente se encuentren circunscriptas a interacciones proteína-proteína a través de los dominios R1 y R2. Estas diferencias podrían explicar los roles predominantes de LNK1 y LNK2, comparado con LNK3 y LNK4, en lo que respecta a la regulación de la floración y la inhibición de la elongación de hipocotilos.

No obstante, la pérdida de función de la familia LNK completa, sí trae como consecuencia notorias alteraciones morfológicas observables en la mutante cuádruple *lnkQ*, siendo un rasgo notorio el incremento considerable en la acumulación de biomasa. En un trabajo muy reciente se demostró que los LNKs interactúan físicamente con la RNA polimerasa II y el complejo de elongación de la transcripción FACT, para la ocupación rítmica de los loci *PRR5* y *TOC1*, regulando así su transcripción circadiana. Esta interacción parece ser importante en la modulación de la iniciación de la transcripción y es mediado por las regiones R1 y R2¹⁸⁶. Es entonces posible que la correcta transcripción de otros genes aparte de *PRR5* y *TOC1* sea regulada también por la familia LNK completa, lo cual explicaría la pleiotropicidad del fenotipo observado en la cuádruple mutante.

Por otro lado, encontramos que las mutantes cuádruples *lnkQ* adultas presenta un fototropismo exacerbado. Las respuestas fototrópicas permiten a las plantas orientar su crecimiento hacia una fuente de luz, maximizando en consecuencia su capacidad fotosintética y crecimiento en ambientes de bajos recursos lumínicos. En angiospermas, los fotoreceptores de luz azul, denominados fototropinas, son los responsables de detectar la dirección de la luz. No obstante, fitocromos y criptocromos (responsables de la detección de la luz roja/roja lejana y azul, respectivamente) también influyen en la modulación del crecimiento asimétrico de hipocotilos, característica del fototropismo. Trabajo previo probó que la expresión de LNK1 y LNK2 es inducida por fitocromos activos²⁸. En plántula etioladas los fitocromos no están involucrados en desencadenar por sí mismos la respuesta fototrópica, pero sí regulan la magnitud de la misma. Es así que los fitocromos, con un rol predominante del fitocromo A, colaboran con la respuesta fototrópica en plántulas etioladas, modulando múltiples pasos de la vía de señalización de las fototropinas¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Recientemente se ha demostrado también que la detección por parte del fitocromo B de una relación baja de luz roja/roja lejana inducida por sombreado, colabora con el fototropismo en plantas verdes des-etioladas, a través de su interacción con genes del tipo PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS

(PIFs) y de la familia génica de biosíntesis de auxina YUCCA¹⁹⁰. En efecto, en un trabajo realizado por Goyal et al., se demostró que distintas vías de señalización de la luz modulan las respuestas fototróficas en diferentes estadios de vida de la planta, resaltando la compleja interconexión entre fitocromos y fototropinas¹⁹⁰. Es posible entonces, que los LNK actúen mediando las vías de señalización río abajo de los fitocromos, actuando como co-activadores y/o co-represores de las respuestas fototróficas mediadas por los genes PIF. De hecho, recientemente se ha demostrado que el factor de transcripción ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), un nodo de señalización río abajo de múltiples fotoreceptores y actor clave de la fotomorfogénesis, se une específicamente a los promotores de todos los genes LNK¹⁹¹.

Esto explicaría el hecho que la cuádruple mutante *lnkQ* presente respuestas fototróficas exacerbadas, lo cual a su vez podría ser responsable de una desinhibición del crecimiento de la mutante conduciendo al incremento de tamaño y biomasa de estas plantas en su estadio vegetativo.

¿Crecer o defenderse? He ahí la cuestión...

Teniendo en cuenta una vez más su naturaleza sésil, las plantas dependen de su crecimiento direccional para la búsqueda de nutrientes y luz, razón por la cual estas invierten numerosos recursos en programas de crecimiento que satisfagan sus necesidades. En simultáneo, las plantas se encuentran expuestas constantemente a organismos vivos, como herbívoros y patógenos, que pueden resultar perjudiciales. En consecuencia, las plantas han desarrollado una gran variedad de mecanismos de defensa. De acuerdo con la hipótesis de la defensa óptima, la activación de estos procesos asociados a la respuesta inmune requiere de la modulación de los recursos invertidos en el crecimiento⁹². Es entonces que la re-asignación de los limitados y valiosos recursos disponibles plantea un dilema clásico: crecer o defenderse; donde las plantas deben crecer lo suficientemente rápido para competir con sus vecinas, pero al mismo tiempo

mantener las adaptaciones fisiológicas (defensas) necesarias para sobrevivir ante la presencia de herbívoros y patógenos¹⁹².

Análisis metabólicos llevados a cabo en un trabajo reciente identificaron que en mutantes de *Arabidopsis thaliana* de crecimiento acelerado la exacerbada acumulación de biomasa resultaba en detrimento de las vías de respuesta a estrés¹⁹³. Este resultado refuerza la idea de compensación entre los procesos de crecimiento y defensa, y presenta la posibilidad que dicho fenómeno pudiese también explicar parcialmente el fenotipo susceptible identificado en las mutantes *lnk*.

De esta manera es probable que en las mutantes *lnk* un fototropismo exacerbado que conduce a un crecimiento desinhibido, sumado a una disfunción circadiana, resulte en un desbalance del delicado equilibrio del sistema vegetal, trayendo como consecuencia una acentuada disminución en la capacidad de respuesta frente al estrés biótico.

Comentarios finales

En el presente trabajo logramos ahondar en el conocimiento actual sobre la implicancia del reloj circadiano en mecanismos de defensa frente a estrés biótico y, de manera recíproca, el efecto que estas vías de respuesta inmune poseen sobre la regulación del oscilador central del reloj. En este proceso reportamos la existencia de deficiencias en la función circadiana de la mutante *eds4*, aislada hace más de 20 años por su susceptibilidad aumentada frente a patógenos bacterianos, y ubicamos físicamente la mutación responsable del fenotipo *eds4* en el genoma de *Arabidopsis thaliana* en un locus que codifica para la proteína NUP205, componente del complejo del poro nuclear (NPC).

La caracterización transcripcional de la mutante pareciera indicar que tanto su fenotipo circadiano como el de susceptibilidad a patógenos podrían estar dados por la expresión diferencial y la retención específica de mensajeros del reloj circadiano en el núcleo, más que por una alteración global del transcriptoma.

En relación a la relevancia del reloj biológico sobre los mecanismos de defensa se identificó la ocurrencia de una interesante desregulación en la expresión de los genes centrales del reloj en plantas salvajes tan solo una hora post infección con bacterias virulentas. El hecho que este perfil de expresión desregulado se asemeje considerablemente al identificado de manera constitutiva en la mutante susceptible *eds4*, nos hace suponer que esta alteración podría resultar detrimental para la planta. Teniendo esto en cuenta, consideramos que es posible que las alteraciones en la expresión de transcritos del reloj sea resultado de una estrategia del patógeno, en la cual el objetivo sea "sabotear" el control de reloj circadiano con el fin de ganar una ventaja en la colonización del sistema vegetal, proceso en el cuál además se vería involucrado el NPC.

En paralelo, identificamos también la relevancia de la familia génica de activadores del reloj LNK en los mecanismos de defensa, la cual probablemente se encuentre dada por la

implicancia de estos en la regulación del reloj así como en mecanismos independientes del mismo.

En conclusión, en el presente no solo reportamos un rol para una proteína del complejo del núcleo poro en el control de los ritmos circadianos, sino que también sentamos las bases para ubicar al NPC como un nodo en las vías de señalización de la interacción planta-patógeno. A su vez, presentamos evidencia que refuerza la relevancia de componentes del oscilador central circadiano en la modulación de la respuesta inmune y reforzamos la hipótesis de un "sabotaje" del reloj circadiano por parte de patógenos como estrategia para una infección exitosa, situando al reloj circadiano como un agente esencial en la disyuntiva de las plantas de crecer o defenderse.

Lic. María José de Leone

Dr. Marcelo J. Yanovsky

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- 1 McClung, C. R. Plant circadian rhythms. *The Plant cell* **18**, 792-803, doi:10.1105/tpc.106.040980 (2006).
- 2 Harmer, S. L. The circadian system in higher plants. *Annual review of plant biology* **60**, 357-377, doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092054 (2009).
- 3 Dodd, A. N. et al. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* **309**, 630-633, doi:10.1126/science.1115581 (2005).
- 4 Wang, Z. Y. & Tobin, E. M. Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* **93**, 1207-1217 (1998).
- 5 Schaffer, R. et al. The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229 (1998).
- 6 Alabadi, D., Yanovsky, M. J., Mas, P., Harmer, S. L. & Kay, S. A. Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*. *Current biology : CB* **12**, 757-761 (2002).
- 7 Mizoguchi, T. et al. LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **2**, 629-641 (2002).
- 8 Adams, S., Manfield, I., Stockley, P. & Carre, I. A. Revised Morning Loops of the *Arabidopsis* Circadian Clock Based on Analyses of Direct Regulatory Interactions. *PloS one* **10**, e0143943, doi:10.1371/journal.pone.0143943 (2015).
- 9 Strayer, C. et al. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**, 768-771 (2000).
- 10 Alabadi, D. et al. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* **293**, 880-883, doi:10.1126/science.1061320 (2001).
- 11 Mas, P., Alabadi, D., Yanovsky, M. J., Oyama, T. & Kay, S. A. Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic responses in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **15**, 223-236 (2003).
- 12 Gendron, J. M. et al. *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 3167-3172, doi:10.1073/pnas.1200355109 (2012).
- 13 Nusinow, D. A. et al. The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* **475**, 398-402, doi:10.1038/nature10182 (2011).
- 14 Helfer, A. et al. LUX ARRHYTHMO encodes a nighttime repressor of circadian gene expression in the *Arabidopsis* core clock. *Current biology : CB* **21**, 126-133, doi:10.1016/j.cub.2010.12.021 (2011).
- 15 Hicks, K. A., Albertson, T. M. & Wagner, D. R. EARLY FLOWERING3 encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **13**, 1281-1292 (2001).
- 16 Doyle, M. R. et al. The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **419**, 74-77, doi:10.1038/nature00954 (2002).
- 17 Hazen, S. P. et al. LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10387-10392, doi:10.1073/pnas.0503029102 (2005).

- 18 Kamioka, M. et al. Direct Repression of Evening Genes by CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 in the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant cell* **28**, 696-711, doi:10.1105/tpc.15.00737 (2016).
- 19 Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M. & Mizuno, T. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in Arabidopsis thaliana: insight into the plant circadian clock. *Plant & cell physiology* **41**, 1002-1012 (2000).
- 20 Farre, E. M., Harmer, S. L., Harmon, F. G., Yanovsky, M. J. & Kay, S. A. Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the Arabidopsis circadian clock. *Current biology : CB* **15**, 47-54, doi:10.1016/j.cub.2004.12.067 (2005).
- 21 Salome, P. A. & McClung, C. R. PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. *The Plant cell* **17**, 791-803, doi:10.1105/tpc.104.029504 (2005).
- 22 Nakamichi, N. et al. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the Arabidopsis circadian clock. *The Plant cell* **22**, 594-605, doi:10.1105/tpc.109.072892 (2010).
- 23 Rawat, R. et al. REVEILLE8 and PSEUDO-RESPONSE REGULATOR5 form a negative feedback loop within the Arabidopsis circadian clock. *PLoS genetics* **7**, e1001350, doi:10.1371/journal.pgen.1001350 (2011).
- 24 Hsu, P. Y., Devisetty, U. K. & Harmer, S. L. Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in Arabidopsis. *eLife* **2**, e00473, doi:10.7554/eLife.00473 (2013).
- 25 Farinas, B. & Mas, P. Functional implication of the MYB transcription factor RVE8/LCL5 in the circadian control of histone acetylation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **66**, 318-329, doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04484.x (2011).
- 26 Dixon, L. E. et al. Temporal repression of core circadian genes is mediated through EARLY FLOWERING 3 in Arabidopsis. *Current biology : CB* **21**, 120-125, doi:10.1016/j.cub.2010.12.013 (2011).
- 27 Chow, B. Y., Helfer, A., Nusinow, D. A. & Kay, S. A. ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the Arabidopsis circadian clock. *Plant signaling & behavior* **7**, 170-173, doi:10.4161/psb.18766 (2012).
- 28 Rugnone, M. L. et al. LNK genes integrate light and clock signaling networks at the core of the Arabidopsis oscillator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 12120-12125, doi:10.1073/pnas.1302170110 (2013).
- 29 Xie, Q. et al. LNK1 and LNK2 are transcriptional coactivators in the Arabidopsis circadian oscillator. *The Plant cell* **26**, 2843-2857, doi:10.1105/tpc.114.126573 (2014).
- 30 Perez-Garcia, P., Ma, Y., Yanovsky, M. J. & Mas, P. Time-dependent sequestration of RVE8 by LNK proteins shapes the diurnal oscillation of anthocyanin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 5249-5253, doi:10.1073/pnas.1420792112 (2015).
- 31 Nohales, M. A. & Kay, S. A. Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nature structural & molecular biology* **23**, 1061-1069, doi:10.1038/nsmb.3327 (2016).
- 32 Mateos, J. L., de Leone, M. J., Torchio, J., Reichel, M. & Staiger, D. Beyond Transcription: Fine-Tuning of Circadian Timekeeping by Post-Transcriptional Regulation. *Genes* **9**, doi:10.3390/genes9120616 (2018).
- 33 Tamura, K. & Hara-Nishimura, I. The molecular architecture of the plant nuclear pore complex. *Journal of experimental botany* **64**, 823-832, doi:10.1093/jxb/ers258 (2013).

- 34 Cheng, Y. T. *et al.* Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in Arabidopsis. *The Plant cell* **21**, 2503-2516, doi:10.1105/tpc.108.064519 (2009).
- 35 Gu, Y. *et al.* Nuclear Pore Permeabilization Is a Convergent Signaling Event in Effector-Triggered Immunity. *Cell* **166**, 1526-1538 e1511, doi:10.1016/j.cell.2016.07.042 (2016).
- 36 Wiermer, M. *et al.* Putative members of the Arabidopsis Nup107-160 nuclear pore sub-complex contribute to pathogen defense. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **70**, 796-808, doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04928.x (2012).
- 37 Zhang, Y. & Li, X. A putative nucleoporin 96 Is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by suppressor of npr1-1, constitutive 1. *The Plant cell* **17**, 1306-1316, doi:10.1105/tpc.104.029926 (2005).
- 38 Dong, C. H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. & Zhu, J. K. The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8281-8286, doi:10.1073/pnas.0602874103 (2006).
- 39 Dong, C. H. *et al.* A putative Arabidopsis nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Molecular and cellular biology* **26**, 9533-9543, doi:10.1128/MCB.01063-06 (2006).
- 40 Parry, G., Ward, S., Cernac, A., Dharmasiri, S. & Estelle, M. The Arabidopsis SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE proteins are nucleoporins with an important role in hormone signaling and development. *The Plant cell* **18**, 1590-1603, doi:10.1105/tpc.106.041566 (2006).
- 41 Robles, L. M., Deslauriers, S. D., Alvarez, A. A. & Larsen, P. B. A loss-of-function mutation in the nucleoporin AtNUP160 indicates that normal auxin signalling is required for a proper ethylene response in Arabidopsis. *Journal of experimental botany* **63**, 2231-2241, doi:10.1093/jxb/err424 (2012).
- 42 MacGregor, D. R. *et al.* HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES1 is required for circadian periodicity through the promotion of nucleo-cytoplasmic mRNA export in Arabidopsis. *The Plant cell* **25**, 4391-4404, doi:10.1105/tpc.113.114959 (2013).
- 43 Lazaro, A., Valverde, F., Pineiro, M. & Jarillo, J. A. The Arabidopsis E3 ubiquitin ligase HOS1 negatively regulates CONSTANS abundance in the photoperiodic control of flowering. *The Plant cell* **24**, 982-999, doi:10.1105/tpc.110.081885 (2012).
- 44 Lu, S. X., Knowles, S. M., Andronis, C., Ong, M. S. & Tobin, E. M. CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL function synergistically in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant physiology* **150**, 834-843, doi:10.1104/pp.108.133272 (2009).
- 45 Nolte, C. & Staiger, D. RNA around the clock - regulation at the RNA level in biological timing. *Frontiers in plant science* **6**, 311, doi:10.3389/fpls.2015.00311 (2015).
- 46 Kim, W. Y. *et al.* ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* **449**, 356-360, doi:10.1038/nature06132 (2007).
- 47 Yu, J. W. *et al.* COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Molecular cell* **32**, 617-630, doi:10.1016/j.molcel.2008.09.026 (2008).
- 48 Mas, P., Kim, W. Y., Somers, D. E. & Kay, S. A. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature* **426**, 567-570, doi:10.1038/nature02163 (2003).

- 49 Baudry, A. et al. F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *The Plant cell* **22**, 606-622, doi:10.1105/tpc.109.072843 (2010).
- 50 Somers, D. E., Devlin, P. F. & Kay, S. A. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* **282**, 1488-1490 (1998).
- 51 Fankhauser, C. & Staiger, D. Photoreceptors in Arabidopsis thaliana: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* **216**, 1-16, doi:10.1007/s00425-002-0831-4 (2002).
- 52 Jones, M. A., Hu, W., Litthauer, S., Lagarias, J. C. & Harmer, S. L. A Constitutively Active Allele of Phytochrome B Maintains Circadian Robustness in the Absence of Light. *Plant physiology* **169**, 814-825, doi:10.1104/pp.15.00782 (2015).
- 53 Strasser, B., Sanchez-Lamas, M., Yanovsky, M. J., Casal, J. J. & Cerdan, P. D. Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 4776-4781, doi:10.1073/pnas.0910446107 (2010).
- 54 Xu, X., Paik, I., Zhu, L. & Huq, E. Illuminating Progress in Phytochrome-Mediated Light Signaling Pathways. *Trends in plant science* **20**, 641-650, doi:10.1016/j.tplants.2015.06.010 (2015).
- 55 Yeom, M. et al. How do phytochromes transmit the light quality information to the circadian clock in Arabidopsis? *Molecular plant* **7**, 1701-1704, doi:10.1093/mp/ssu086 (2014).
- 56 Huang, H. et al. Identification of Evening Complex Associated Proteins in Arabidopsis by Affinity Purification and Mass Spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **15**, 201-217, doi:10.1074/mcp.M115.054064 (2016).
- 57 Li, G. et al. Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in Arabidopsis. *Nature cell biology* **13**, 616-622, doi:10.1038/ncb2219 (2011).
- 58 Gould, P. D. et al. The molecular basis of temperature compensation in the Arabidopsis circadian clock. *The Plant cell* **18**, 1177-1187, doi:10.1105/tpc.105.039990 (2006).
- 59 Wenden, B. et al. Light inputs shape the Arabidopsis circadian system. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **66**, 480-491, doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04505.x (2011).
- 60 Kolmos, E., Chow, B. Y., Pruneda-Paz, J. L. & Kay, S. A. HsfB2b-mediated repression of PRR7 directs abiotic stress responses of the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 16172-16177, doi:10.1073/pnas.1418483111 (2014).
- 61 Chow, B. Y. et al. Transcriptional regulation of LUX by CBF1 mediates cold input to the circadian clock in Arabidopsis. *Current biology : CB* **24**, 1518-1524, doi:10.1016/j.cub.2014.05.029 (2014).
- 62 Gutierrez, R. A. et al. Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4939-4944, doi:10.1073/pnas.0800211105 (2008).
- 63 Dodd, A. N. et al. The Arabidopsis circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop. *Science* **318**, 1789-1792 (2007).
- 64 Chen, Y. Y. et al. Iron is involved in the maintenance of circadian period length in Arabidopsis. *Plant physiology* **161**, 1409-1420, doi:10.1104/pp.112.212068 (2013).
- 65 Salome, P. A., Oliva, M., Weigel, D. & Kramer, U. Circadian clock adjustment to plant iron status depends on chloroplast and phytochrome function. *The EMBO journal* **32**, 511-523, doi:10.1038/emboj.2012.330 (2013).

- 66 Perea-Garcia, A. et al. Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* **67**, 391-403, doi:10.1093/jxb/erv474 (2016).
- 67 Andres-Colas, N., Perea-Garcia, A., Puig, S. & Penarrubia, L. Deregulated copper transport affects *Arabidopsis* development especially in the absence of environmental cycles. *Plant physiology* **153**, 170-184, doi:10.1104/pp.110.153676 (2010).
- 68 Haydon, M. J., Mielczarek, O., Robertson, F. C., Hubbard, K. E. & Webb, A. A. Photosynthetic entrainment of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock. *Nature* **502**, 689-692, doi:10.1038/nature12603 (2013).
- 69 Hanano, S., Domagalska, M. A., Nagy, F. & Davis, S. J. Multiple phytohormones influence distinct parameters of the plant circadian clock. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **11**, 1381-1392, doi:10.1111/j.1365-2443.2006.01026.x (2006).
- 70 Nagel, D. H. et al. Genome-wide identification of CCA1 targets uncovers an expanded clock network in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, E4802-4810, doi:10.1073/pnas.1513609112 (2015).
- 71 Harmer, S. L. et al. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-2113 (2000).
- 72 Michael, T. P. et al. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS genetics* **4**, e14, doi:10.1371/journal.pgen.0040014 (2008).
- 73 Piechulla, B. 'Circadian clock' directs the expression of plant genes. *Plant molecular biology* **22**, 533-542 (1993).
- 74 Kreps, J. A. & Kay, S. A. Coordination of Plant Metabolism and Development by the Circadian Clock. *The Plant cell* **9**, 1235-1244, doi:10.1105/tpc.9.7.1235 (1997).
- 75 Greenham, K. & McClung, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature reviews. Genetics* **16**, 598-610, doi:10.1038/nrg3976 (2015).
- 76 Dowson-Day, M. J. & Millar, A. J. Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **17**, 63-71 (1999).
- 77 Nozue, K. et al. Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* **448**, 358-361, doi:10.1038/nature05946 (2007).
- 78 Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C. & Fankhauser, C. Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **53**, 312-323, doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03341.x (2008).
- 79 Niwa, Y., Yamashino, T. & Mizuno, T. The circadian clock regulates the photoperiodic response of hypocotyl elongation through a coincidence mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* **50**, 838-854, doi:10.1093/pcp/pcp028 (2009).
- 80 Yanovsky, M. J. & Kay, S. A. Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 265-275, doi:10.1038/nrm1077 (2003).
- 81 Jackson, S. D. Plant responses to photoperiod. *The New phytologist* **181**, 517-531, doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02681.x (2009).
- 82 GARNER, W. W. & ALLARD, H. A. EFFECT OF THE RELATIVE LENGTH OF DAY AND NIGHT AND OTHER FACTORS OF THE ENVIRONMENT ON GROWTH AND REPRODUCTION IN PLANTS. *Monthly Weather Review* **48**, 415-415, doi:10.1175/1520-0493(1920)48<415b:EOTRLO>2.0.CO;2 (1920).

- 83 Pittendrigh, C. S. & Minis, D. H. The Entrainment of Circadian Oscillations by Light and Their Role as Photoperiodic Clocks. *The American Naturalist* **98**, 261-294, doi:10.1086/282327 (1964).
- 84 Amasino, R. Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**, 1001-1013, doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x (2010).
- 85 Tiwari, S. B. et al. The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *The New phytologist* **187**, 57-66, doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03251.x (2010).
- 86 Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R. & Coupland, G. The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**, 847-857 (1995).
- 87 Valverde, F. et al. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**, 1003-1006, doi:10.1126/science.1091761 (2004).
- 88 de Montaigu, A., Toth, R. & Coupland, G. Plant development goes like clockwork. *Trends in genetics : TIG* **26**, 296-306, doi:10.1016/j.tig.2010.04.003 (2010).
- 89 Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A. & Imaizumi, T. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* **318**, 261-265, doi:10.1126/science.1146994 (2007).
- 90 Song, Y. H., Smith, R. W., To, B. J., Millar, A. J. & Imaizumi, T. FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* **336**, 1045-1049, doi:10.1126/science.1219644 (2012).
- 91 McKey, D. Adaptive Patterns in Alkaloid Physiology. *The American Naturalist* **108**, 305-320, doi:10.1086/282909 (1974).
- 92 Meldau, S., Erb, M. & Baldwin, I. T. Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of botany* **110**, 1503-1514, doi:10.1093/aob/mcs212 (2012).
- 93 Baldwin, I. T. & Meldau, S. Just in time: circadian defense patterns and the optimal defense hypothesis. *Plant signaling & behavior* **8**, e24410, doi:10.4161/psb.24410 (2013).
- 94 Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F. & Metraux, J. P. The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in plant science* **5**, 274, doi:10.3389/fpls.2014.00274 (2014).
- 95 Zeng, W., Melotto, M. & He, S. Y. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Current opinion in biotechnology* **21**, 599-603, doi:10.1016/j.copbio.2010.05.006 (2010).
- 96 Grimmer, M. K., John Foulkes, M. & Paveley, N. D. Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *Journal of experimental botany* **63**, 4321-4331, doi:10.1093/jxb/ers143 (2012).
- 97 Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N. & Bednarek, P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *The New phytologist* **206**, 948-964, doi:10.1111/nph.13325 (2015).
- 98 Boller, T. & Felix, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* **60**, 379-406, doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346 (2009).
- 99 Macho, A. P. et al. A bacterial tyrosine phosphatase inhibits plant pattern recognition receptor activation. *Science* **343**, 1509-1512, doi:10.1126/science.1248849 (2014).
- 100 Nuhse, T. S., Bottrill, A. R., Jones, A. M. & Peck, S. C. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane

- proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **51**, 931-940, doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03192.x (2007).
- 101 Rayapuram, N. et al. Identification of novel PAMP-triggered phosphorylation and dephosphorylation events in *Arabidopsis thaliana* by quantitative phosphoproteomic analysis. *Journal of proteome research* **13**, 2137-2151, doi:10.1021/pr401268v (2014).
- 102 Jeworutzki, E. et al. Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **62**, 367-378, doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04155.x (2010).
- 103 Torres, M. A., Jones, J. D. & Dangl, J. L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology* **141**, 373-378, doi:10.1104/pp.106.079467 (2006).
- 104 Scheler, C., Durner, J. & Astier, J. Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Current opinion in plant biology* **16**, 534-539, doi:10.1016/j.pbi.2013.06.020 (2013).
- 105 Testerink, C. & Munnik, T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of experimental botany* **62**, 2349-2361, doi:10.1093/jxb/err079 (2011).
- 106 Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. & He, S. Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980, doi:10.1016/j.cell.2006.06.054 (2006).
- 107 Day, B., Henty, J. L., Porter, K. J. & Staiger, C. J. The pathogen-actin connection: a platform for defense signaling in plants. *Annual review of phytopathology* **49**, 483-506, doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095426 (2011).
- 108 Luna, E. et al. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **24**, 183-193, doi:10.1094/MPMI-07-10-0149 (2011).
- 109 Lee, J. Y. et al. A plasmodesmata-localized protein mediates crosstalk between cell-to-cell communication and innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **23**, 3353-3373, doi:10.1105/tpc.111.087742 (2011).
- 110 Ahuja, I., Kissen, R. & Bones, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science* **17**, 73-90, doi:10.1016/j.tplants.2011.11.002 (2012).
- 111 Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology* **43**, 205-227, doi:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923 (2005).
- 112 Avni, A., Bailey, B. A., Mattoo, A. K. & Anderson, J. D. Induction of ethylene biosynthesis in *Nicotiana tabacum* by a *Trichoderma viride* xylanase is correlated to the accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase transcripts. *Plant physiology* **106**, 1049-1055 (1994).
- 113 Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. & Boller, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **18**, 265-276 (1999).
- 114 Albert, I. et al. An RLP23-SOBIR1-BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nature plants* **1**, 15140, doi:10.1038/nplants.2015.140 (2015).
- 115 Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J. D. & Katagiri, F. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **53**, 763-775, doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03369.x (2008).

- 116 Halim, V. A. et al. PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **57**, 230-242, doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03688.x (2009).
- 117 Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J. & Katagiri, F. Network properties of robust immunity in plants. *PLoS genetics* **5**, e1000772, doi:10.1371/journal.pgen.1000772 (2009).
- 118 Couto, D. & Zipfel, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature reviews. Immunology* **16**, 537-552, doi:10.1038/nri.2016.77 (2016).
- 119 Jones, J. D. & Dangl, J. L. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329, doi:10.1038/nature05286 (2006).
- 120 Cunnac, S., Lindeberg, M. & Collmer, A. Pseudomonas syringae type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current opinion in microbiology* **12**, 53-60, doi:10.1016/j.mib.2008.12.003 (2009).
- 121 Kvitko, B. H. et al. Deletions in the repertoire of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS pathogens* **5**, e1000388, doi:10.1371/journal.ppat.1000388 (2009).
- 122 Nomura, K., Melotto, M. & He, S. Y. Suppression of host defense in compatible plant-Pseudomonas syringae interactions. *Current opinion in plant biology* **8**, 361-368, doi:10.1016/j.pbi.2005.05.005 (2005).
- 123 Kay, S. & Bonas, U. How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. *Current opinion in microbiology* **12**, 37-43, doi:10.1016/j.mib.2008.12.006 (2009).
- 124 Jacob, F., Vernaldi, S. & Maekawa, T. Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. *Frontiers in immunology* **4**, 297, doi:10.3389/fimmu.2013.00297 (2013).
- 125 Greenberg, J. T. & Yao, N. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular microbiology* **6**, 201-211 (2004).
- 126 Fu, Z. Q. & Dong, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual review of plant biology* **64**, 839-863, doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105606 (2013).
- 127 Gaffney, T. et al. Requirement of salicylic Acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**, 754-756, doi:10.1126/science.261.5122.754 (1993).
- 128 Sauerbrunn, N. & Schlaich, N. L. PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. *Planta* **218**, 552-561, doi:10.1007/s00425-003-1143-z (2004).
- 129 Zhang, C. et al. Crosstalk between the circadian clock and innate immunity in Arabidopsis. *PLoS pathogens* **9**, e1003370, doi:10.1371/journal.ppat.1003370 (2013).
- 130 Wang, W. et al. Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* **470**, 110-114, doi:10.1038/nature09766 (2011).
- 131 Bhardwaj, V., Meier, S., Petersen, L. N., Ingle, R. A. & Roden, L. C. Defence responses of Arabidopsis thaliana to infection by Pseudomonas syringae are regulated by the circadian clock. *PLoS one* **6**, e26968, doi:10.1371/journal.pone.0026968 (2011).
- 132 Huang, W. et al. Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science* **336**, 75-79, doi:10.1126/science.1219075 (2012).
- 133 Liu, T., Carlsson, J., Takeuchi, T., Newton, L. & Farre, E. M. Direct regulation of abiotic responses by the Arabidopsis circadian clock component PRR7. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **76**, 101-114, doi:10.1111/tpj.12276 (2013).
- 134 Liu, T. L., Newton, L., Liu, M. J., Shiu, S. H. & Farre, E. M. A G-Box-Like Motif Is Necessary for Transcriptional Regulation by

- Circadian Pseudo-Response Regulators in Arabidopsis. *Plant physiology* **170**, 528-539, doi:10.1104/pp.15.01562 (2016).
- 135 Nakamichi, N. et al. Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 17123-17128, doi:10.1073/pnas.1205156109 (2012).
- 136 Karpinski, S., Gabrys, H., Mateo, A., Karpinska, B. & Mullineaux, P. M. Light perception in plant disease defence signalling. *Current opinion in plant biology* **6**, 390-396 (2003).
- 137 Ingle, R. A. et al. Jasmonate signalling drives time-of-day differences in susceptibility of Arabidopsis to the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **84**, 937-948, doi:10.1111/tpj.13050 (2015).
- 138 Zhou, M. et al. Redox rhythm reinforces the circadian clock to gate immune response. *Nature* **523**, 472-476, doi:10.1038/nature14449 (2015).
- 139 Korneli, C., Danisman, S. & Staiger, D. Differential control of pre-invasive and post-invasive antibacterial defense by the Arabidopsis circadian clock. *Plant & cell physiology* **55**, 1613-1622, doi:10.1093/pcp/pcu092 (2014).
- 140 Lu, H., McClung, C. R. & Zhang, C. Tick Tock: Circadian Regulation of Plant Innate Immunity. *Annual review of phytopathology* **55**, 287-311, doi:10.1146/annurev-phyto-080516-035451 (2017).
- 141 Li, B., Meng, X., Shan, L. & He, P. Transcriptional Regulation of Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Cell host & microbe* **19**, 641-650, doi:10.1016/j.chom.2016.04.011 (2016).
- 142 Li, Z., Bonaldi, K., Uribe, F. & Pruneda-Paz, J. L. A Localized *Pseudomonas syringae* Infection Triggers Systemic Clock Responses in Arabidopsis. *Current biology : CB* **28**, 630-639 e634, doi:10.1016/j.cub.2018.01.001 (2018).
- 143 Murray, M. G. & Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* **8**, 4321-4325 (1980).
- 144 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671-675 (2012).
- 145 Koornneef, M. Isolation of higher plant developmental mutants. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **45**, 1-19 (1991).
- 146 Clough, S. J. & Bent, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **16**, 735-743 (1998).
- 147 Sun, H. & Schneeberger, K. SHOREmap v3.0: fast and accurate identification of causal mutations from forward genetic screens. *Methods Mol Biol* **1284**, 381-395, doi:10.1007/978-1-4939-2444-8_19 (2015).
- 148 Schneeberger, K. et al. SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nature methods* **6**, 550-551, doi:10.1038/nmeth0809-550 (2009).
- 149 Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. & Pepper, A. E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **14**, 387-392 (1998).
- 150 Neff, M. M., Turk, E. & Kalishman, M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends in genetics : TIG* **18**, 613-615 (2002).
- 151 Weigel, D. & Glazebrook, J. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002).

- 152 Mockler, T. C. et al. The DIURNAL project: DIURNAL and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **72**, 353-363, doi:10.1101/sqb.2007.72.006 (2007).
- 153 Bologna, N. G. et al. Nucleo-cytosolic Shuttling of ARGONAUTE1 Prompts a Revised Model of the Plant MicroRNA Pathway. *Molecular cell* **69**, 709-719 e705, doi:10.1016/j.molcel.2018.01.007 (2018).
- 154 Lamesch, P. et al. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic acids research* **40**, D1202-1210, doi:10.1093/nar/gkr1090 (2012).
- 155 Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105-1111, doi:10.1093/bioinformatics/btp120 (2009).
- 156 Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140, doi:10.1093/bioinformatics/btp616 (2010).
- 157 Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**, 289-300 (1995).
- 158 Hulsen, T., de Vlieg, J. & Alkema, W. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**, 488, doi:10.1186/1471-2164-9-488 (2008).
- 159 Katari, M. S. et al. VirtualPlant: a software platform to support systems biology research. *Plant physiology* **152**, 500-515, doi:10.1104/pp.109.147025 (2010).
- 160 Fankhauser, C. & Casal, J. J. Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **39**, 747-760, doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02148.x (2004).
- 161 Glazebrook, J. & Ausubel, F. M. Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8955-8959 (1994).
- 162 Glazebrook, J., Rogers, E. E. & Ausubel, F. M. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982 (1996).
- 163 Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S. & Dong, X. Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *The Plant cell* **6**, 1583-1592, doi:10.1105/tpc.6.11.1583 (1994).
- 164 Century, K. S., Holub, E. B. & Staskawicz, B. J. NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6597-6601 (1995).
- 165 Gupta, V., Willits, M. G. & Glazebrook, J. *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **13**, 503-511, doi:10.1094/MPMI.2000.13.5.503 (2000).
- 166 Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C. & Dickerman, A. Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in plant science* **13**, 483-491, doi:10.1016/j.tplants.2008.06.003 (2008).
- 167 Kosova, B., Pante, N., Rollenhagen, C. & Hurt, E. Nup192p is a conserved nucleoporin with a preferential location at the inner site of the nuclear membrane. *The Journal of biological chemistry* **274**, 22646-22651 (1999).

- 168 Tamura, K., Fukao, Y., Iwamoto, M., Haraguchi, T. & Hara-Nishimura, I. Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* **22**, 4084-4097, doi:10.1105/tpc.110.079947 (2010).
- 169 Szabo, A. et al. Ubiquitylation Dynamics of the Clock Cell Proteome and TIMELESS during a Circadian Cycle. *Cell reports* **23**, 2273-2282, doi:10.1016/j.celrep.2018.04.064 (2018).
- 170 Parry, G. Assessing the function of the plant nuclear pore complex and the search for specificity. *Journal of experimental botany* **64**, 833-845, doi:10.1093/jxb/ers289 (2013).
- 171 Parry, G. Components of the *Arabidopsis* nuclear pore complex play multiple diverse roles in control of plant growth. *Journal of experimental botany* **65**, 6057-6067, doi:10.1093/jxb/eru346 (2014).
- 172 Howard, B. E. et al. High-throughput RNA sequencing of pseudomonas-infected *Arabidopsis* reveals hidden transcriptome complexity and novel splice variants. *PloS one* **8**, e74183, doi:10.1371/journal.pone.0074183 (2013).
- 173 Glazebrook, J. et al. Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **34**, 217-228 (2003).
- 174 Ashelford, K. et al. Full genome re-sequencing reveals a novel circadian clock mutation in *Arabidopsis*. *Genome biology* **12**, R28, doi:10.1186/gb-2011-12-3-r28 (2011).
- 175 Raices, M. & D'Angelo, M. A. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 687-699, doi:10.1038/nrm3461 (2012).
- 176 Raices, M. & D'Angelo, M. A. Nuclear pore complexes and regulation of gene expression. *Current opinion in cell biology* **46**, 26-32, doi:10.1016/j.ceb.2016.12.006 (2017).
- 177 Goldberg, M. W. & Allen, T. D. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. *Journal of molecular biology* **257**, 848-865, doi:10.1006/jmbi.1996.0206 (1996).
- 178 Allen, J. L. & Douglas, M. G. Organization of the nuclear pore complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of ultrastructure and molecular structure research* **102**, 95-108 (1989).
- 179 Roberts, K. & Northcote, D. H. Structure of the nuclear pore in higher plants. *Nature* **228**, 385-386 (1970).
- 180 Fiserova, J., Kiseleva, E. & Goldberg, M. W. Nuclear envelope and nuclear pore complex structure and organization in tobacco BY-2 cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **59**, 243-255, doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03865.x (2009).
- 181 Braud, C., Zheng, W. & Xiao, W. LON1 encoding a nucleoporin is required for embryogenesis and seed viability in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **160**, 823-836, doi:10.1104/pp.112.202192 (2012).
- 182 Lu, Q. et al. *Arabidopsis* homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **61**, 259-270, doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04048.x (2010).
- 183 Jacob, Y., Mongkolsirawatana, C., Velez, K. M., Kim, S. Y. & Michaels, S. D. The nuclear pore protein AtTPR is required for RNA homeostasis, flowering time, and auxin signaling. *Plant physiology* **144**, 1383-1390, doi:10.1104/pp.107.100735 (2007).
- 184 Zhao, Q. & Meier, I. Identification and characterization of the *Arabidopsis* FG-repeat nucleoporin Nup62. *Plant signaling & behavior* **6**, 330-334, doi:10.4161/psb.6.3.13402 (2011).

- 185 Zhou, M. et al. LNK1 and LNK2 Corepressors Interact with the MYB3 Transcription Factor in Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant physiology* **174**, 1348-1358, doi:10.1104/pp.17.00160 (2017).
- 186 Ma, Y., Gil, S., Grasser, K. D. & Mas, P. Targeted Recruitment of the Basal Transcriptional Machinery by LNK Clock Components Controls the Circadian Rhythms of Nascent RNAs in Arabidopsis. *The Plant cell* **30**, 907-924, doi:10.1105/tpc.18.00052 (2018).
- 187 Goyal, A., Szarzynska, B. & Fankhauser, C. Phototropism: at the crossroads of light-signaling pathways. *Trends in plant science* **18**, 393-401, doi:10.1016/j.tplants.2013.03.002 (2013).
- 188 Parks, B. M., Quail, P. H. & Hangarter, R. P. Phytochrome A regulates red-light induction of phototropic enhancement in Arabidopsis. *Plant physiology* **110**, 155-162 (1996).
- 189 Janoudi, A. K., Gordon, W. R., Wagner, D., Quail, P. & Poff, K. L. Multiple phytochromes are involved in red-light-induced enhancement of first-positive phototropism in Arabidopsis thaliana. *Plant physiology* **113**, 975-979 (1997).
- 190 Goyal, A. et al. Shade Promotes Phototropism through Phytochrome B-Controlled Auxin Production. *Current biology : CB* **26**, 3280-3287, doi:10.1016/j.cub.2016.10.001 (2016).
- 191 Hajdu, A. et al. ELONGATED HYPOCOTYL 5 mediates blue light signalling to the Arabidopsis circadian clock. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **96**, 1242-1254, doi:10.1111/tpj.14106 (2018).
- 192 Herms, D. A. & Mattson, W. J. The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**, 283-335, doi:10.1086/417659 (1992).
- 193 Augustijn, D., Tol, N. V., van der Zaal, B. J., de Groot, H. J. M. & Alia, A. High-resolution magic angle spinning NMR studies for metabolic characterization of Arabidopsis thaliana mutants with enhanced growth characteristics. *PloS one* **13**, e0209695, doi:10.1371/journal.pone.0209695 (2018).

Material
suplementario

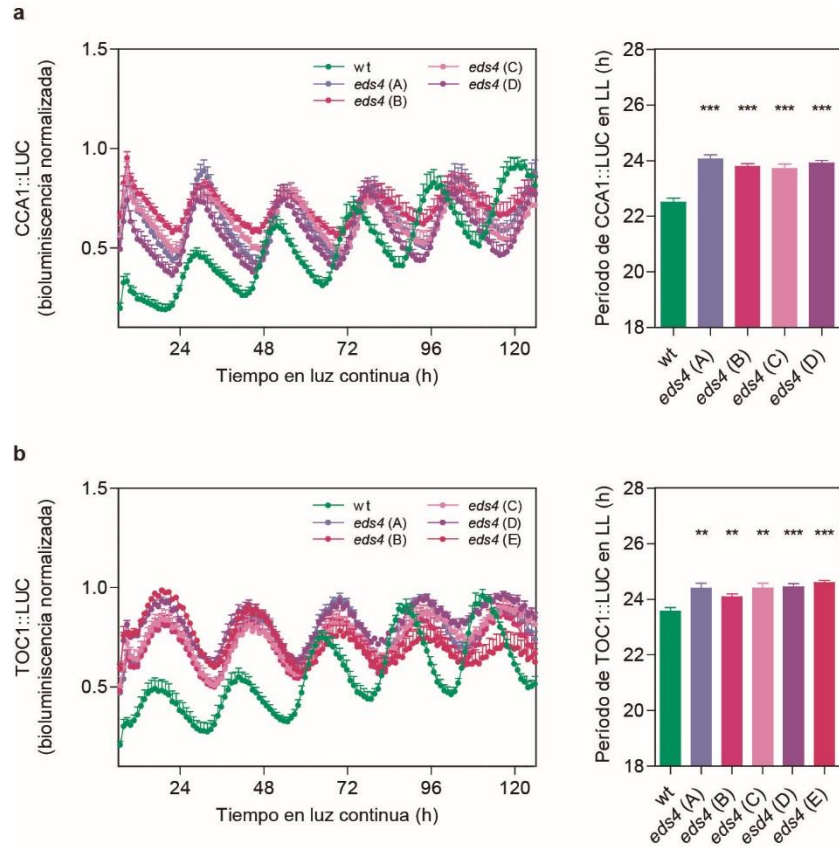


Figura suplementaria 1. Perfiles de expresión alterados para genes centrales del reloj en líneas reporteras de *eds4*. Actividad de CCA1::LUC (**a**) y TOC1::LUC (**b**) medida en luz blanca continua luego de un entrenamiento en condiciones de día largo. Los períodos asociados a los ritmos circadianos fueron estimados por FFT-NLS con el software BRASS 3.0. Las barras de error indican s.e.m. **P < 0.01; ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

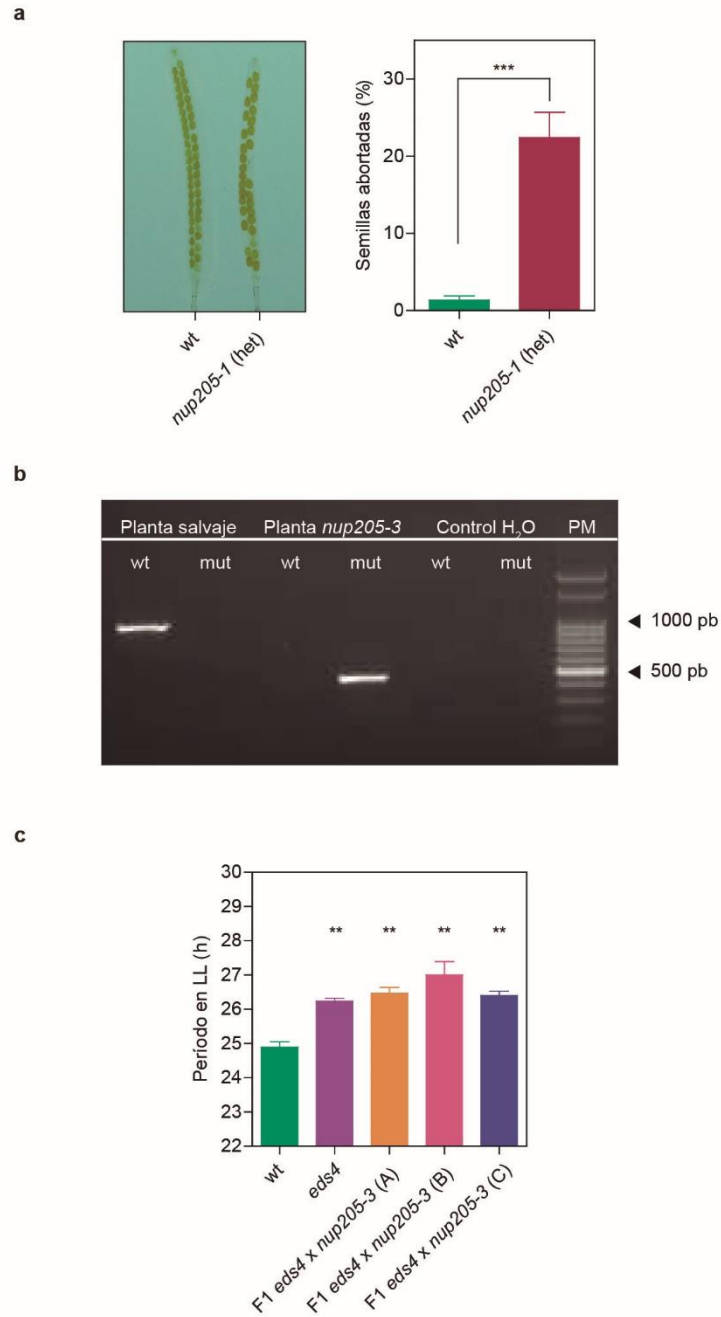


Figura suplementaria 2. Letalidad del alelo *nup205-1* y ensayos de complementación del fenotipo mutante *eds4*. (a) Porcentaje de semillas abortadas contadas en silicuas clarificadas de plantas wt y heterocigotas *nup205-1* (n=8). Este experimento fue repetido en dos ocasiones con resultados similares. (b) Caracterización de las inserciones de T-DNA en la mutante homocigota *nup205-3*. Se muestra la separación electroforética de los productos de la PCR de genotipificación en un gel de agarosa 1% revelado con Bromuro de Etidio (0.5µg/ ml). wt: par de primers LP y RP que amplifican el alelo salvaje, mut: par de primers RP y LB3 que amplifican el alelo mutante *nup205-3*, PM: peso molecular. (c) Períodos asociados a las oscilaciones en el ángulo formado por el primer par de hojas

en plántulas de 10 días entrenadas en día largo y luego transferidas a luz continua, para los genotipos wt, *eds4*, *nup205-3* y múltiples poblaciones obtenidas a partir de cruza independiente entre las dos mutantes (F1) (n=5). Estos experimentos se repitieron al menos 3 veces con resultados similares. Las barras de error indican s.e.m. **P < 0.01, ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

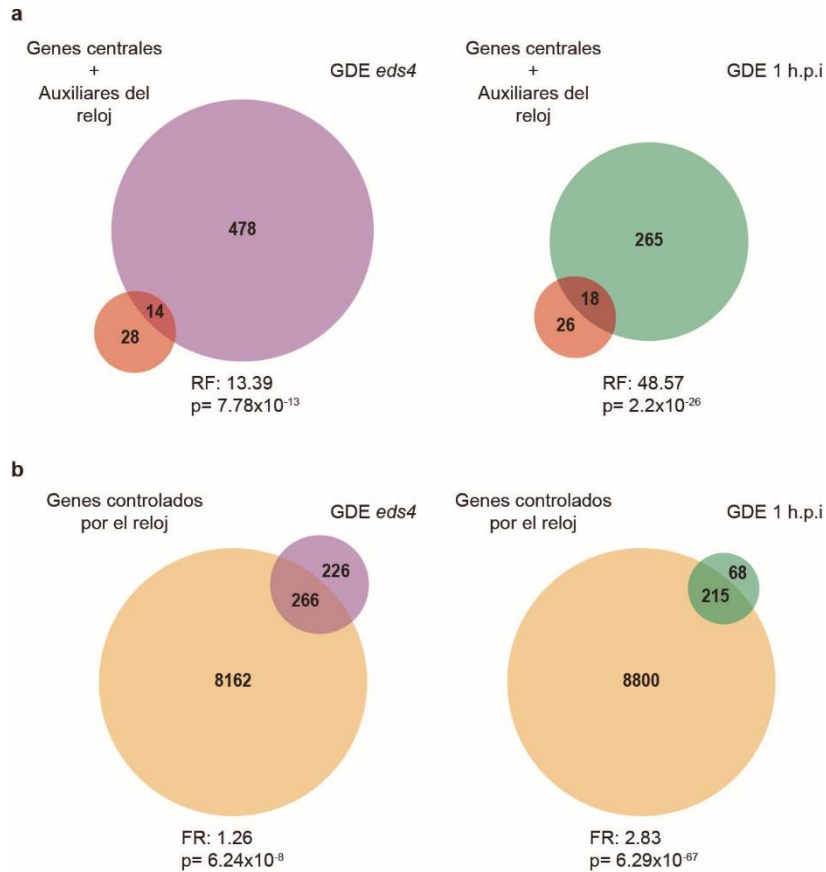


Figura suplementaria 3. Los genes diferencialmente expresados (GDE) en *eds4* en condiciones no infectivas y en plantas wt luego de una infección con patógenos se encuentran enriquecidos en genes relacionados al reloj. (a y b) Superposición entre GDEs en las mutantes *eds4* en condiciones no infectivas en luz continua (GDE *eds4*), GDEs en plantas wt 1 hora luego de la infección con *P. syringae* DC3000 (GDE 1 hpi) (Log2FC > |0,58| and FDR ≤ 0,15) y genes del reloj más genes auxiliares del reloj (a) o genes controlados por el reloj (b). La significancia del factor de representación (FR) fue evaluada utilizando una prueba hipergeométrica (p ≤ 0,05).

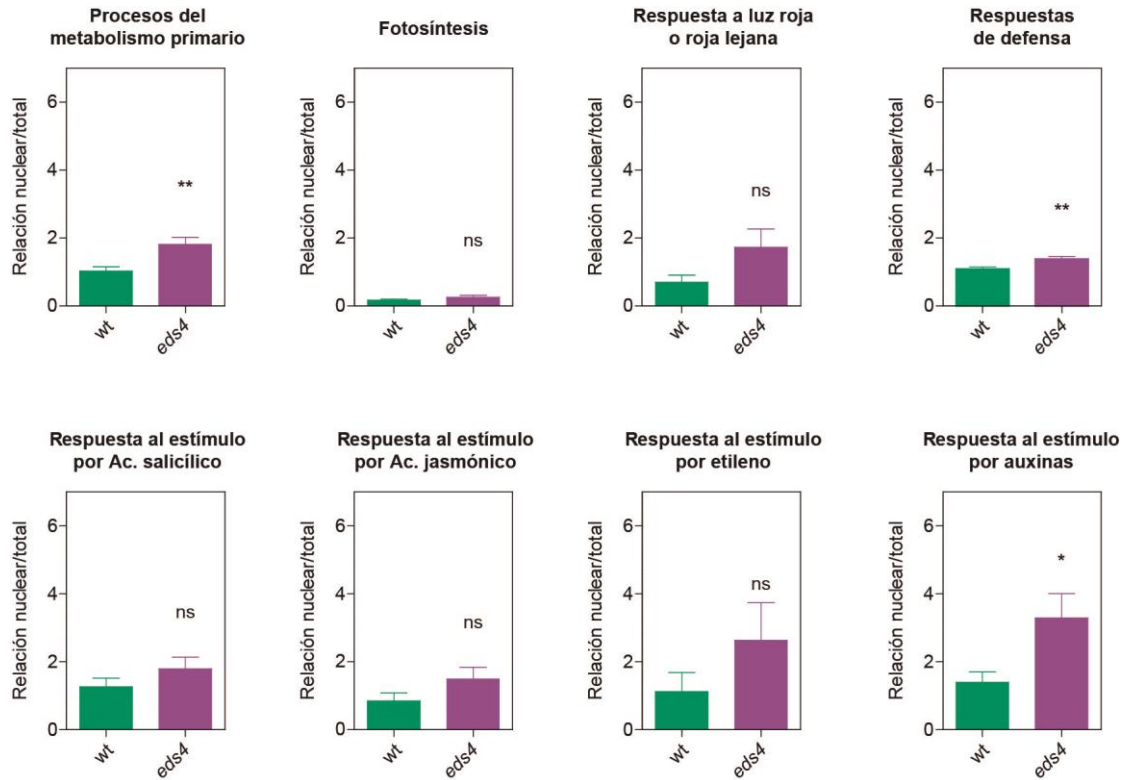


Figura suplementaria 4. Efecto de EDS4 en la distribución núcleo-citoplasmática de transcritos. Relación de abundancia entre transcritos localizados en el núcleo y transcritos localizados en núcleo y citoplasma (total) para las ontologías genéticas o categorías funcionales de los transcritos diferencialmente retenidos. Las barras de error indican s.e.m. **P < 0.01, ***P < 0.001 (Prueba t de Student).

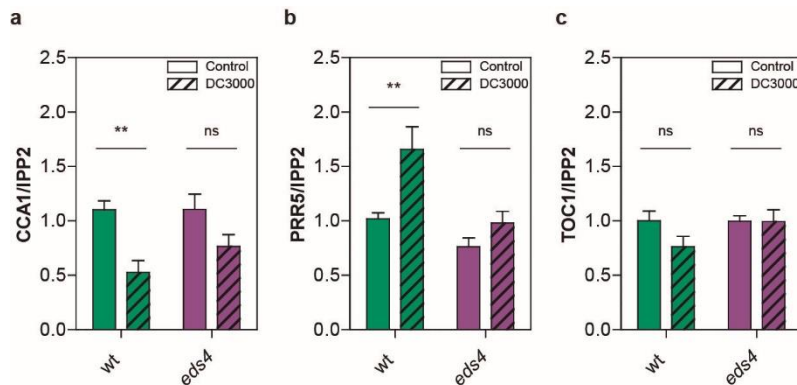


Figura suplementaria 5. Modificaciones transcripcionales en genes centrales del reloj luego de una infección por patógenos. Niveles de expresión relativos de *CCA1*, *PRR5* y *TOC1*, medidos por RT-qPCR. El análisis fue realizado en plantas wt y *eds4* crecidas en SD, 1 hora posterior a la infiltración (en ZT=2) con una solución control ($MgSO_4$ 10 mM) o una suspensión bacteriana (DC3000, $OD_{600}=0.0002$) (n=8). Las barras de error indican s.e.m. Los asteriscos por encima de las barras indican la significancia de la diferencia entre plantas tratadas con el control vs plantas del

mismo genotipo infectadas. ns, no significativo, *P < 0.05; **P < 0.01 (ANOVA de dos vías seguido de pruebas de Bonferroni).

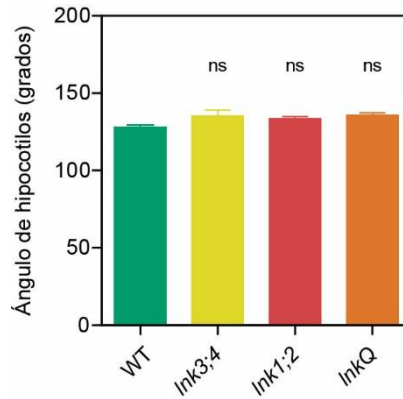


Figura suplementaria 6. Las plántulas de las mutantes LNK no presentan alteraciones en sus respuestas fototrópicas. Medición de los ángulos que forman los hypocotilos al orientarse hacia una fuente lateral de luz azul. Las barras de error indican s.e.m. ns, no significativo (Prueba t de Student).

Crom.	SNP	Posición	Nombre <i>primer</i>	Secuencia	Enzima
1	1	11465962	C1SNP1_FW	ATCTTGTAATTTTCTCTATTGGTGGTGTG	Ddel
			C1SNP1_RV	CAGGTGAAACTCTAGGGATATCATGCTCA	
1	9	22123620	C1SNP9_FW	CACCGGTCAGTGCAGTCTTAGCCAATCTG	Hpy188I
			C1SNP9_RV	TGCAAGACAAGTAGACAACCTAACAAAGT	
5	1	15459529	C5SNP1_FW	ATGTAATTTATTGTTTCAGGGGATTGGAG	Ddel
			C5SNP1_RV	GTTTCAAGCCATCATACTTTCCAGTCTGA	
5	2	15938235	C5SNP2_FW	TTTGAGCAATAGACTTGAGACCATCCTCA	Ddel
			C5SNP2_RV	TGCGACTCAACAAAACGAATCCTTTCTCG	
5	3	17484480	C5SNP3_FW	TGAACTTTCTTTATAACAAAATAAAAACGT	NdeI
			C5SNP3_RV	CATTATCCTAATTAATAATTTAGACTCATAT	
5	4	18663767	C5SNP4_FW	TTGGTTTATAATATCAGGTGAAGAACTAA	Ddel
			C5SNP4_RV	CTTCTCTAGCTCCTCTCTACAAGATTAAT	
5	5	19012403	C5SNP5_FW	ATGTGTTGATCTTGTGTTACACGCACATAT	NdeI
			C5SNP5_RV	ATTACATTAACCAATAGAACCTCAAACCG	
5	6	19073559	C5SNP6_FW	TTCGTCATGCCACTTTTGAAGAGGTCAC	Hpy188I
			C5SNP6_RV	ACGCTTCTTGTTAAGACCAATATCCCTCC	
5	7	19283321	C5SNP7_FW	GGTTGACAGAGGATGAGAGGTTTGAATCA	Hpy188I
			C5SNP7_RV	CATTCATGATGTGAGCTTTTGACAAAACC	
5	8	20818109	C5SNP8_FW	ATTGTTTCGTGACGTCGTTGAGTTTATCAA	RsaI
			C5SNP8_RV	AAATATGACCTGAACTACTTGCCTACGT	
5	9	22066865	C5SNP9_FW	TCAAACACTCGTGCAAATATAAGATATT	Hpy188I
			C5SNP9_RV	TTTTGAGTTTTTGATCATGTTTGTGCTG	
5	10	22120057	C5SNP10_FW	TCAAGGGTTAGGGTTAAGCAAGTAGAGGA	Hpy188I
			C5SNP10_RV	CCATACACTCTTGCAAACCTCATCGATCCG	

Tabla suplementaria 1. Primers y enzimas de restricción correspondientes utilizados para la identificación de SNPs en la técnica de dCAPs.

Subcomplejo	Nup	Gen ID
Anillo interno	Nup155	AT1G14850
	Nup35	AT3G16310
	Nup205	AT5G51200
	Nup188	AT4G38760
	CPR5	AT5G64930
Anillo externo	Nup160	AT1G33410
	Seh1	AT1G64350
	Nup96	AT1G80680
	Nup133	AT2G05120
	Sec13	AT2G30050
	Nup107	AT3G14120
	Nup43	AT4G30840
	Nup75	AT4G32910
	ALADIN	AT3G56900
	RAE1	AT1G80670
	Elys/HOS1	AT2G39810
GLE1	AT1G13120	
FG Nups centrales	Nup98/Nup98b	AT1G10390/AT1G59660
	Nup54	AT1G24310
	Nup58	AT4G37130
	Nup35	AT3G16310
	Nup62	AT2G45000
Filamentos y FG Nups nucleocitoplasmáticos	CGI	AT1G75340
	Nup214	AAD10642
Linker Nups	Nup93a	AT2G41620
	Nup88	AT5G05680
Canasta y FG Nups nucleares	Nup50a/Nup50b	AT1G52380/AT3G15970
	Nup1 /136	AT3G10650
	Tpr/NUA	AT1G79280
Anillo transmembrana	gp210	AT5G40480
	NDC1	AT1G73240

Tabla suplementaria 2. Agrupación en sub-complejos de los componentes del poro nuclear de acuerdo a la clasificación propuesta por Tamura et. al³³.

Nombre <i>primer</i>	Secuencia
CCA1_FW	CAAGAACACTCCGAGGCATCAAAG
CCA1_RV	CTGTCTCCTGCTCCATCTGAACC
PRR5_FW	CGAGAAGCCGCTTTAACCAA
PRR5_RV	CGGCTCTCGTAACGAACCTT
TOC1_FW	AACACCAAACAAGCACGCAGAG
TOC1_RV	TGAGCCATTTCCATTGACAAGAGG
RVE1_FW	GCTCAAAGACCGCAGTTCAGATTC
RVE1_RV	CCATCACCTCCAGTTGCTTCTCG
LNK1_FW	CTGGATGGGAAAAGTGATGG
LNK1_RV	CACATCTCGCTGTTGGAATG
LNK2_FW	TTATTCCGGTTGGCTGGTAG
LNK2_RV	ATCTGGCATCCCAGCATATC
LNK3_FW	CCTGAAGCAGCTGAGAAATG
LNK3_RV	GCCTTCGAAATCGTGAAGTG
LNK4_FW	AGGATGTTCCAGGGAATGAG
LNK4_RV	TGCATCCTCCTCCATAAGTG
IPP2_FW	GTATGAGTTGCTTCTCCAGCAAAG
IPP2_RV	GAGGATGGCTGCAACAAGTGT

Tabla suplementaria 3. *Primers* utilizados para las mediciones de genes centrales del reloj biológico por qPCR.