



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

El catabolismo de los jasmonatos por la sulfotransferasa ST2a promueve el crecimiento y la habilidad competitiva en *Arabidopsis*

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

Lic. Micaela Zoe Lichy

Director de tesis: Dr. Carlos Luis Ballaré

Consejero de estudios: Dr. Pablo Diego Cerdán

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológica y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura (IFEVA), UBA-CONICET

Buenos Aires, 2024

El catabolismo de los jasmonatos por la sulfotransferasa ST2a promueve el crecimiento y la habilidad competitiva en *Arabidopsis*

Resumen

En las plantas, el crecimiento y la resistencia a la herbivoría suelen estar correlacionados negativamente. Los jasmonatos son fitohormonas con un rol clave en los mecanismos que regulan esta relación antagónica. Estos compuestos lipídicos orquestan la acumulación de defensas químicas contra los atacantes y, al mismo tiempo, son potentes inhibidores del crecimiento. La sulfotransferasa 2a (ST2a) es una enzima involucrada en el catabolismo de los jasmonatos y se ha propuesto que desempeña un papel en la optimización del crecimiento y la habilidad competitiva en plantas que crecen en un canopeo denso. En este trabajo evaluamos la relevancia de la vía de inactivación de jasmonatos mediada por ST2a en un contexto de competencia real con plantas vecinas. Plantas incapaces de inactivar jasmonatos por esta vía (mutantes *st2a-1*) mostraron un mayor flujo de jasmonatos hacia la formación de conjugados bioactivos que las plantas salvajes. Este cambio en el flujo metabólico en plantas *st2a-1* estuvo acompañado de una menor tasa de crecimiento y una mayor resistencia a un insecto herbívoro (*Spodoptera frugiperda*). La resistencia al patógeno *Botrytis cinerea* (también regulada por la vía de los jasmonatos) no fue afectada por la mutación *st2a-1* en nuestras condiciones. La producción de frutos de las plantas *st2a-1* se vio muy comprometida en cultivos mixtos, donde compitieron con plantas salvajes. Sin embargo, en monocultivos, la producción de frutos de las mutantes *st2a-1* fue igual a la de las plantas salvajes. Concluimos que la atenuación de la señalización de jasmonatos a través de ST2a es un determinante importante de la capacidad competitiva y es necesaria para maximizar el *fitness* individual en *Arabidopsis*. Manipular la inactivación de jasmonatos con herramientas biotecnológicas podría tener utilidad en el desarrollo de cultivos más compactos o resistentes a plagas, si un mecanismo semejante al descrito para *Arabidopsis* operara en especies de interés agronómico.

Palabras claves: competencia, compromiso crecimiento-defensas, herbivoría, inmunidad de las plantas, jasmonatos, sulfotransferasa.

Jasmonate catabolism by the sulfotransferase ST2a promotes growth and competitive ability in *Arabidopsis*

Abstract

In plants, growth and resistance to herbivory are often negatively correlated. Jasmonates are key phytohormones in the mechanisms that regulate this trade-off. These lipid-derived compounds orchestrate the accumulation of chemical defenses against attackers and, at the same time, they are potent inhibitors of plant growth. The sulfotransferase 2a (ST2a) is an enzyme involved in jasmonate catabolism and it has been proposed to play a role optimizing growth and competitive ability in plants growing in dense stands. In this work, we evaluated the relevance of the ST2a-mediated jasmonate inactivation pathway in a context of real competition with neighboring plants. Loss-of-function *st2a-1* plants, which are unable to inactivate jasmonates by sulfation, showed an increased overall flux of jasmonates toward the formation of bioactive conjugates compared to wild type plants. This redirection of the metabolic flux in *st2a-1* plants was accompanied by reduced plant growth and enhanced resistance against an herbivorous insect (*Spodoptera frugiperda*). The resistance against the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* (which is also regulated by the jasmonate pathway) was not affected by the *st2a-1* mutation under our experimental conditions. The fruit production of *st2a-1* plants was greatly compromised in mixed cultures, where they competed with wild type plants. In monocultures, however, the fruit production of *st2a-1* mutants did not differ from that of wild type canopies. We conclude that attenuation of jasmonate signaling through ST2a is an important determinant of competitive ability and it is required to maximize individual fitness in *Arabidopsis*. If a similar mechanism of jasmonate inactivation operates in species of agronomic interest, its manipulation via biotechnology could represent an interesting avenue to generate more compact or pest-resistant crops.

Key words: growth-defense trade-off, herbivory, jasmonates, plant competition, plant immunity, sulfotransferase

Agradecimientos

Por un lado, quiero agradecer a la educación pública (en particular a la UBA) y al CONICET que me permitieron formarme.

Por otro lado, quiero agradecer a todas las personas que estuvieron acompañándome desde distintos lugares durante estos años y sin las cuales no podría estar terminando esta tesis.

A mi director el Dr. Carlos Ballaré por abrirme las puertas del laboratorio y guiarme durante todo el doctorado. Por las recomendaciones sobre el diseño experimental y sobre todo la fructífera discusión de los resultados.

A Miriam Cargnel, por acompañarme desde el primer año con los consejos para crecer las plantas de *Arabidopsis* en el invernáculo, hasta los últimos años ayudándome en los experimentos finales; y en el medio con la discusión de trabajos relevantes durante la pandemia.

A Guada, por las extracciones para medir fitohormonas en Jena, pero sobre todo porque como antecesora de la línea ST2a siempre tuvo comentarios oportunos en las discusiones de resultados en el laboratorio que me ayudaron a mejorar mis experimentos. Y muchísimas gracias por la lectura a conciencia de esta tesis!

A Ani con quien desde el primer año del doctorado, cuando estaba una más perdida que la otra, nos fuimos acompañando y aprendiendo juntas. A Pato, por su ayuda en la cuantificación de glucosinolatos y por mantener la cepa de *B. cinera*, pero principalmente por enseñarme a trabajar en el laboratorio y por los consejos y el aliento cuando los resultados no eran los esperados. A Ro por sus tips sobre real-times, y su incansable energía y buena onda siempre para ayudar. Gracias Ro, Ani y Pato por todas las charlas y mates compartidos, no habría podido llegar hasta acá sin ese espacio de discusión de resultados (y de la vida en general).

A mis compañeros/as que pasaron por el laboratorio durante estos años: Meco, Bruno, Lau y Lucas; de cada una/o aprendí algo. Y gracias por darme una mano en la siembra o cosecha de experimentos grandes.

A Carlos Crocco y Milena Manzur que como investigadores del grupo me orientaron en los primeros años.

A la gente del “labo grande”, en especial a Belu, Eze y Gabi. Gracias por la buena predisposición siempre que les pedía ayuda y por revisar todo el freezer buscando los primers que necesitaba!

A Gabriela Cordon por su dedicación y paciencia al ayudarme con las mediciones de fluorescencia de la clorofila.

A Laura Ventura por mantener la colonia de *S. frugiperda* y siempre estar atenta y ayudar a coordinar el tiempo de los ciclos de los insectos con los tiempos de las plantas.

A Ro Sellaró por apoyarme los últimos meses para que termine de corregir la tesis.

A Seba por su ayuda en todo lo que tiene que ver con el funcionamiento de la computadora.

A Gonzalo y Antonio por la buena predisposición a ayudar con la liofilización de muestras.

A toda mi familia por apoyarme pese a que la mayor parte de las veces que preguntaban por mi trabajo no quería contarles mucho (no era con ustedes, sino que a veces estaba un poco frustrada). Principalmente a mi mamá, mi papá, mi hermano y la abu. A Silvi, Sergio, Lau y Santy. A mis tías/os Di, Gusty, Vivi, Ire y Rulo. A mis primas/os Facu, Naia, Viole, Sol, Celes, Vicky, Belu y Manu. A mis tíos/as y primos/as postizos Vero, Lau, León, Edu, Luli, Joaco y Eze.

A mis amigas de siempre Mel, Barby, Juli, Sofi, Dani, Mary, Anita y Caro. A mis amigas de la FCEN, Romi, Julia y Mar. Gracias por todas las charlas y viajecitos compartidos. Siempre sentí su apoyo, aunque yo les contara poco de mi trabajo.

A Sele, Ele, Vicen, Karlita, Pancha, Pablo, Fabi, Franco, Pablo C, Luna y todo el equipo de Voley FAUBA, por ser mi lugar de descarga durante el doctorado, pero sobre todo por ser un grupo de gente hermosa. Estos años no hubieran sido tan divertidos sin los miles de entrenamientos, birras y rondas de cumbia y chacarera compartidas.

A Juli por acompañarme siempre. Por escuchar atento los días que estaba con ganas de hablar de mis experimentos (y terminar aprendiendo un montón de fisiología vegetal) y por bancar que en otros momentos no quisiera contar nada. Por los miles de mates y almuerzos en los días que me quedaba a escribir la tesis en casa. Por todo.

ÍNDICE

Capítulo 1: Introducción, objetivos e hipótesis.....	3
Percepción de plantas vecinas.....	4
Señales lumínicas de competencia.....	4
Señales mecánicas de competencia.....	5
Señales químicas de competencia.....	6
Percepción de atacantes y activación de las defensas.....	6
Antagonismo entre el crecimiento y las defensas.....	7
Los jasmonatos.....	9
Biosíntesis y señalización del JA-Ile.....	9
Diversidad de jasmonatos.....	11
ST2a en el balance entre el crecimiento y las defensas.....	13
Otros mecanismos involucrados en el balance crecimiento-defensas.....	14
Implicancias del antagonismo crecimiento-defensas en cultivos.....	16
Objetivos e hipótesis.....	18
Capítulo 2: Materiales y Métodos.....	19
Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	20
Cuantificación de fitohormonas.....	21
Cuantificación de metabolitos de defensa.....	21
Expresión génica.....	22
Bioensayos con <i>Botrytis cinerea</i>	23
Experimentos con <i>Spodoptera frugiperda</i>	24
Parámetros de crecimiento y productividad.....	26
Análisis estadístico.....	27
Capítulo 3: Resultados.....	29
Respuestas de plantas Col-0 a nuestro tratamiento de competencia.....	30
Caracterización de plantas Col-0 y <i>st2a-1</i> en condiciones de competencia.....	31
Perfil hormonal.....	31
Expresión de genes y metabolitos marcadores de jasmonatos.....	37
Crecimiento y susceptibilidad a atacantes.....	40
El costo de no poder inactivar jasmonatos por la vía de ST2a sobre la producción de frutos.....	43
El efecto de la herbivoría.....	44
El efecto del genotipo de las plantas vecinas.....	45
Capítulo 4: Discusión y Conclusiones.....	48

La presencia de plantas vecinas parece producir un aumento en la concentración de jasmonatos.....	49
Plantas <i>st2a-1</i> hiperacumulan jasmonatos bioactivos.....	50
Plantas <i>st2a-1</i> son más resistentes a larvas de <i>S. frugiperda</i> , pero son igual de susceptibles a <i>B. cinerea</i> que las Col-0.....	51
Las plantas <i>st2a-1</i> son malas competidoras, tanto en presencia como en ausencia de herbívoros.....	53
En monocultivos la producción de frutos de plantas <i>st2a-1</i> fue similar a la de plantas salvajes.....	55
Conclusiones generales.....	56
Anexo.....	58
Introducción: jasmonatos y respuestas a alta intensidad de luz.....	59
Materiales y métodos.....	60
Plantas y condiciones de crecimiento.....	60
Cuantificación de metabolitos y expresión génica.....	61
Cuantificación de área y masa foliar.....	61
Cuantificación de fluorescencia de la clorofila.....	61
Análisis estadístico.....	62
Resultados.....	62
Discusión y Conclusión.....	70
Referencias.....	72

Capítulo 1: Introducción, objetivos e hipótesis

Percepción de plantas vecinas

Las plantas, al ser organismos fotosintéticos, dependen de la disponibilidad de radiación fotosintéticamente activa (PAR 400-700 nm), fuente de energía necesaria para la fijación de CO₂. Por lo tanto, la reducción de la PAR debido al sombreado de plantas vecinas (por debajo de ciertos niveles que dependen de cada especie) puede comprometer fuertemente el desarrollo de la planta y su éxito reproductivo. Es por esto que, en plantas intolerantes a la sombra, se han seleccionado a lo largo de la evolución mecanismos que les permiten detectar el sombreado, y responder modificando su crecimiento para lograr una mayor intercepción de la luz. A esta respuesta se la conoce como el síndrome de escape al sombreado (SAS por sus siglas en inglés) e implica un crecimiento en altura de la planta (alargamiento del hipocotilo, tallo y pecíolos, posicionamiento erecto de las hojas e inhibición de las ramificaciones), que permite posicionar el tejido fotosintético en un estrato más alto del canopeo (Casal, 2012).

Por otro lado, las plantas también compiten con plantas vecinas por los nutrientes y el agua disponibles en el suelo; y son capaces de responder a la presencia de vecinas modificando la arquitectura y dirección del crecimiento de la raíz (Caffaro et al., 2013; Craine, 2005; Muñoz-Parra et al., 2017; Padilla et al., 2013).

La presencia de plantas vecinas genera una gran diversidad de señales (lumínicas, mecánicas, químicas) que pueden ser percibidas por las plantas, y otorgan información sobre las vecinas que la rodean, desencadenando respuestas específicas a esta competencia (Ballaré & Pierik, 2017; Yoneyama & Bennett, 2023) (Fig. 1.1.A).

Señales lumínicas de competencia

La luz, además de ser fuente de energía para las plantas, es una importante fuente de información sobre el ambiente en el que se encuentran. De la luz solar, los tejidos verdes de las plantas absorben, reflejan y transmiten diferencialmente cada longitud de onda, por lo que la proximidad de plantas vecinas afecta tanto la intensidad como la calidad de la luz (Fiorucci & Fankhauser, 2017). De la PAR, las hojas absorben principalmente en el rojo (R, $\lambda = 600-700$ nm) y en el azul ($\lambda = 400-500$ nm), mientras que reflejan en el rojo lejano (RL, $\lambda = 700-750$ nm). Además, el tejido foliar absorbe en el ultravioleta-A (UV-A, $\lambda = 315-400$ nm) y UV-B ($\lambda = 280-315$ nm) (Fiorucci & Fankhauser, 2017). Las plantas son capaces de detectar cambios en la calidad de la luz incluso en condiciones que no generan un sombreado real, cuando las vecinas se encuentran a una distancia que no afecta a la intensidad de PAR que reciben. Esto se debe a la propagación lateral del RL reflejado por los tejidos fotosintéticos. El aumento en el RL es una de las primeras señales de proximidad de vecinas que detectan las plantas (Ballaré et al., 1990). Luego, a medida que crece el canopeo, disminuye la luz R, azul, UV-A y UV-B (Casal, 2012) (Fig. 1.1.B).

Las plantas son capaces de detectar estos cambios en la intensidad y la calidad de la luz por medio de fotorreceptores, moléculas fotosensibles que desencadenan respuestas celulares.

Los fotorreceptores más estudiados en cuanto a la detección de plantas vecinas y las respuestas de escape al sombreado son los fitocromos, en particular el fitocromo B (phyB). Estos fotorreceptores absorben luz en la longitud de onda del R y del RL, y tienen dos conformaciones foto-reversibles. La forma inactiva Pr, en la cual es sintetizado el fitocromo, absorbe principalmente en el R y se transforma en la forma Pfr (activa), que a su vez absorbe principalmente en el RL y se inactiva a la forma Pr. El phyB también se inactiva lentamente en oscuridad. Por lo tanto, la actividad del phyB es modulada por la intensidad de luz R y por la relación R/RL (Li et al., 2011). Además de los fitocromos, existen otros fotorreceptores involucrados en la percepción del sombreado. Los criptocromos perciben cambios principalmente en la luz azul y UV-A, y UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) en la luz UV-B (De Wit et al., 2016; Fraser et al., 2016; Hayes et al., 2014; Keller et al., 2011) (Fig. 1.1.B).

Los fitocromos y criptocromos activos interaccionan con los PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs), inhibiendo su actividad. Los PIFs son factores de transcripción que promueven la expresión de genes vinculados al crecimiento y las respuestas del SAS. Las principales fitohormonas promotoras del crecimiento son las auxinas (IAAs), y su biosíntesis es regulada de forma positiva por los PIFs (Fiorucci & Fankhauser, 2017; Leivar & Monte, 2014; Leivar & Quail, 2011). Además, fitocromos, criptocromos y UVR8 estabilizan a factores de transcripción que promueven la fotomorfogénesis e inhiben a los PIFs, al regular la actividad del complejo ubiquitina ligasa CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 / SUPPRESSOR OF PHA-105 (COP1/SPA) (Fiorucci & Fankhauser, 2017; Huber et al., 2021).

Por lo tanto, los cambios en el ambiente lumínico generados por la presencia de plantas vecinas promueven las respuestas de SAS mediante una red de regulación compleja que involucra a distintos fotorreceptores (Fernández-Milmanda & Ballaré, 2021; Huber et al., 2021).

Señales mecánicas de competencia

El contacto mecánico entre las puntas de las hojas antecede a los cambios en el ambiente lumínico, en plantas que presentan un crecimiento horizontal (en forma de roseta) (De Wit et al., 2012). Este contacto entre hojas produce una respuesta de hiponastia (aumento del ángulo foliar), y es esta elevación de las hojas la que lleva a que disminuya la relación R/RL en un cultivo denso de *Arabidopsis* (De Wit et al., 2012). Recientemente se describió que la hiponastia en respuesta al contacto mecánico involucra a un mecanismo distinto al movimiento hiponástico en respuesta a RL, y requiere de una onda de calcio citosólico que comienza en los tricomas de la punta de las hojas y se expande hasta los pecíolos (Pantazopoulou et al., 2023). Además, está reportado que pueden transmitirse señales eléctricas y de especies reactivas del oxígeno entre plantas vecinas que tengan hojas en contacto, evidenciando nuevos mecanismos posibles de comunicación por medio del contacto foliar (Szechyńska-Hebda et al., 2022).

Señales químicas de competencia

Por otro lado, existen mecanismos de comunicación entre plantas vecinas por medio de señales químicas. Las plantas pueden enviar y recibir señales a través de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) y por medio de exudados radiculares. Estas comunicaciones se estudiaron principalmente en respuesta a estreses bióticos o abióticos, donde se cree que tienen una función “alertando” a plantas vecinas, ya que desencadenan respuestas de defensa en plantas que de hecho aún no sufrieron el estrés (Ameye et al., 2018; Baldwin & Schultz, 1983; Falik et al., 2012; Ninkovic et al., 2021; Sweeney et al., 2017). También se piensa que los VOCs y exudados radiculares tienen un rol en la percepción temprana de vecinas, permitiéndoles a las plantas obtener información sobre la identidad y el estado de quienes las rodean y responder de manera específica (Badri et al., 2012; Caffaro et al., 2013; Chen et al., 2019; Kegge et al., 2015; Ninkovic et al., 2016; Semchenko et al., 2014; Wang et al., 2021).

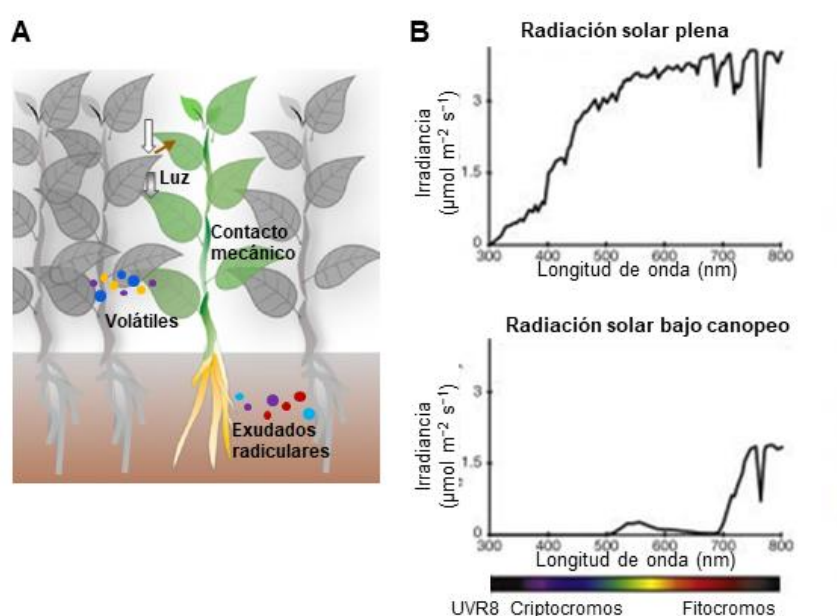


Figura 1.1. Señales indicadoras de la presencia de plantas vecinas. A) Se representan algunas de las señales que se cree perciben las plantas como indicadores de la presencia de vecinas: 1) Cambios en el ambiente lumínico, 2) Contacto mecánico entre hojas, 3) Compuestos orgánicos volátiles, y 4) Metabolitos provenientes de exudados radiculares. Se representa la radiación incidente sobre una hoja con una flecha blanca, la radiación transmitida con una flecha gris, y la radiación reflejada con una flecha bordó. Figura adaptada de Yoneyama & Bennett, 2023. B) Cambios en el ambiente lumínico causados por un canopy. Se muestran los espectros de la radiación solar plena (superior) y de la radiación solar bajo un canopy denso (inferior). Se esquematiza el espectro electromagnético y se indican las longitudes de onda percibidas por los principales fotorreceptores involucrados en las respuestas de escape al sombreado. Figura adaptada de Fiorucci & Fankhauser, 2017.

Percepción de atacantes y activación de las defensas

A lo largo de la evolución, se han seleccionado en las plantas una gran diversidad de estrategias para defenderse de patógenos y herbívoros, que llevan a reducir los daños ocasionados por consumidores. Los mecanismos de defensa pueden ser constitutivos (las

plantas los expresan todo el tiempo) o inducibles (se expresan en respuesta a la presencia de atacantes); directos (aquellos que restringen al atacante) o indirectos (mecanismos que atraen a predadores o parasitoides de los atacantes) (Heil, 2008; War et al., 2012; Wu & Baldwin, 2009).

Una percepción temprana de los atacantes es crucial para que las defensas inducibles resulten eficaces. Las plantas son capaces de detectar la presencia de atacantes por medio de patrones moleculares no-propios (patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a herbívoros (HAMPs)). Ejemplos de PAMPs son la flagelina y lipooligosacáridos presentes en bacterias, la quitina de la pared celular fúngica y glucanos de oomycetes. Ejemplos de HAMPs presentes en herbívoros son volicitina e inceptinas. Las plantas también reconocen a moléculas propias que se acumulan de forma pasiva por el daño causado en los tejidos (patrones moleculares asociadas al daño (DAMPs)), como los oligogalacturonidos (fragmentos de pectina, polisacárido presente en la pared celular vegetal) (Erb & Reymond, 2019; Gust et al., 2017). Además, las plantas producen señales de daño secundarias que abarcan a una diversidad de oligopéptidos agrupados con el nombre de fitocitocinas, por su función análoga a las citocinas animales indicando invasión o daño celular (Gust et al., 2017). Los PAMPs, HAMPs y DAMPs son percibidos por la planta por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), y en respuesta al reconocimiento de estas señales, las plantas inducen la expresión de defensas, orquestadas principalmente por la acción de fitohormonas como los jasmonatos, el ácido salicílico (SA) y el etileno (ET) (Abdul Malik et al., 2020; Acevedo et al., 2015; Erb & Reymond, 2019; Ge et al., 2022; Gust et al., 2017).

A lo largo de la co-evolución de las plantas con sus atacantes, patógenos y herbívoros desarrollaron moléculas efectoras que atenúan la activación de las defensas, y a su vez, las plantas pueden ser capaces de reconocer estas moléculas efectoras y activar mecanismos de protección específicos (Ge et al., 2022; Spoel & Dong, 2012).

Antagonismo entre el crecimiento y las defensas

Existe una compensación entre el crecimiento y las defensas. Cuando las plantas detectan la presencia de patógenos o herbívoros, inducen mecanismos de defensa, a la vez que suelen restringir el crecimiento (Ballaré et al., 2012; Cipollini et al., 2017; Garcia et al., 2021; Van Dijk et al., 2021). Por el contrario, cuando las plantas detectan la presencia de vecinas promueven el crecimiento, atenuando las defensas (Ballaré et al., 2012; Chan, 2022; De Wit et al., 2013). Las defensas pueden ser costosas para las plantas. Por un lado, los recursos utilizados en la biosíntesis de metabolitos de defensa no van a estar disponibles para el crecimiento (Bekaert et al., 2012; Gershenson, 1994). Por otro lado, las defensas pueden tener costos ecológicos (efectos negativos de las defensas en la interacción de las plantas con su ambiente biótico o abiótico), de oportunidad (pequeñas diferencias en el crecimiento que no afectarían de por sí al éxito reproductivo, pero que pueden llevar a desventajas si la planta se encuentra

compitiendo con vecinas) y de autotoxicidad (efectos negativos de las defensas en el metabolismo de las plantas) (Cipollini et al., 2017; Züst & Agrawal, 2017).

El uso de herramientas genéticas permitió desacoplar las respuestas de defensa de las de crecimiento, evidenciando que, al menos en ciertas condiciones, no es la asignación de recursos limitantes lo que lleva a esta compensación entre el crecimiento y las defensas (Campos et al., 2016; Cerrudo et al., 2017; Moreno et al., 2009). Se han descrito mecanismos moleculares que regulan el antagonismo entre el crecimiento y las defensas en respuesta a señales de competidoras y de atacantes (Fernández-Milmanda & Ballaré, 2021). Esto permitió que, mediante la manipulación genética, se pudieran obtener plantas más resistentes, sin que esto conlleve una penalidad en el crecimiento (al menos en condiciones controladas) (Campos et al., 2016; Cerrudo et al., 2017; Fernández-Milmanda et al., 2020; Hu et al., 2013; Tang et al., 2020; L. Yang et al., 2021). Sin embargo, hasta el momento no está claro si esto se mantiene en un contexto natural, donde pueden entrar en juego los costos ecológicos y de oportunidad de las defensas.

El antagonismo entre crecimiento y defensas podría surgir de un conflicto configuracional (Ballaré & Austin, 2019). La base de este antagonismo no está en la disponibilidad de recursos presentes o futuros, sino que restringir el crecimiento formaría parte de una respuesta integral de defensa de las plantas para minimizar la exposición a patógenos o herbívoros. Una configuración óptima en un contexto con atacantes foliares, que implica una baja relación vástago: raíz, hojas gruesas y compactas, tallos bajos y con un alto número de ramificaciones, es perjudicial para competir con plantas vecinas. De la misma forma que una configuración óptima para interceptar luz en competencia con plantas vecinas (una alta relación vástago: raíz, hojas delgadas con pecíolos largos, y tallos altos sin ramificaciones) es mala para defenderse de atacantes (Ballaré & Austin, 2019) (Fig. 1.2).

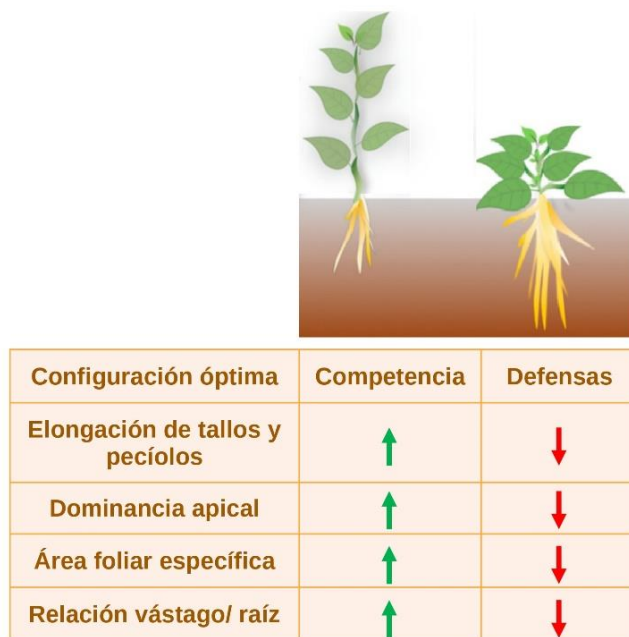


Figura 1.2. Conflicto configuracional entre fenotipos de competencia y de defensa. Se muestran dibujos esquemáticos de las configuraciones óptimas para competir y para defenderse de atacantes (consumidores de

tejido aéreo). En la tabla se enumeran distintas respuestas morfológicas y con flechas se indica la dirección del cambio en este carácter en la configuración óptima de competencia y de defensa (flecha verde hacia arriba = aumento; flecha roja hacia abajo = disminución). Figura adaptada de Ballaré & Austin, 2019.

Los jasmonatos

Los jasmonatos son fitohormonas que clásicamente se asociaron con las respuestas de defensa frente a insectos herbívoros y patógenos necrótrofos. En presencia de estos atacantes, los niveles de jasmonatos aumentan, e inducen distintos mecanismos de defensa (Howe et al., 2018; Howe & Jander, 2008). Estos mecanismos incluyen metabolitos especializados (como glucosinolatos, alcaloides, compuestos fenólicos y terpenos), proteínas de defensa (mirosinasas, inhibidores de proteasas, enzimas oxidativas) y barreras físicas (como la producción de tricomas y la disminución del número y la apertura de estomas) (Feng et al., 2021; Förster et al., 2019; Han et al., 2018; Li, Wang et al., 2021; Wang et al., 2007; Wasternack & Strnad, 2019). Además, los jasmonatos promueven tanto defensas directas como indirectas (Heil, 2008).

A la vez que promueven las defensas químicas, los jasmonatos son potentes inhibidores del crecimiento, lo que los vuelve hormonas claves en el balance entre el crecimiento y las defensas. Los jasmonatos inhiben el crecimiento de la raíz, la elongación del hipocotilo y la expansión de las hojas (Huang et al., 2017). El efecto de los jasmonatos sobre el crecimiento se debe tanto a una reducción en la expansión como en la división celular (Noir et al., 2013; Zhang & Turner, 2008). Además, los jasmonatos están involucrados en distintos procesos a lo largo del desarrollo de las plantas: inhibición de la germinación, promoción de la senescencia foliar, inhibición del pasaje del crecimiento vegetativo al reproductivo, promoción del desarrollo de estambres (Huang et al., 2017; Linkies & Leubner-Metzger, 2012; Pan et al., 2020; Zhai et al., 2015). Se ha reportado que, en ausencia de atacantes, la respuesta a jasmonatos tiene costos en cuanto al crecimiento y éxito reproductivo en una gran variedad de especies, aunque la magnitud de estos costos depende del contexto en el que se evalúen (Baldwin, 1998; Cipollini et al., 2017; Guo et al., 2018, 2022; Van Dam & Baldwin, 2001).

Además, los jasmonatos juegan un rol importante en respuesta a estreses abióticos. Se reportaron funciones en la aclimatación y tolerancia a frío, sequía, salinidad, calor, anegamiento, alta intensidad de luz, ozono y metales pesados (Raza et al., 2021; Wang et al., 2020).

Biosíntesis y señalización del JA-Ile

Dentro de los jasmonatos, la forma biológicamente más activa en angiospermas es el jasmonoil-isoleucina (JA-Ile). Su biosíntesis comienza en los cloroplastos, con la liberación de ácido linoléico a partir de lípidos de la membrana, catalizada por fosfolipasas (Kimberlin et al., 2022). Se identificaron DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE1 (DAD1) y PLASTID LIPASE2 (PLIP2)/PLIP3 como las lipasas necesarias para la biosíntesis de jasmonatos en estambres y en respuesta al ácido abscísico (ABA), respectivamente (Ishiguro et al., 2001; Wang et al., 2018).

Sin embargo, hay controversias sobre cuáles son las lipasas que catabolizan la liberación de ácido linoleico en respuesta a atacantes (posiblemente debido a que existe redundancia génica) (Ellinger et al., 2010; Ishiguro et al., 2001; Kimberlin et al., 2022; Wang et al., 2018). El ácido linoléico es metabolizado en los cloroplastos por las enzimas LIPOXYGENASE (LOX), ALLENE OXIDE SYNTHASE (AOS) y ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC), para dar ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) (Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Strnad, 2018). En *Arabidopsis* existen 4 isoenzimas LOX, 1 AOS y 4 AOC. Alternativamente, la biosíntesis puede comenzar con la liberación de ácidos grasos hexadecatrienoicos de la membrana y en este caso, tras ser metabolizado por las mismas 3 enzimas, se produce ácido dinor-12-oxo-fitodienoico (dnOPDA). El OPDA y dnOPDA son transportados al citosol y luego a los peroxisomas, donde son reducidos por 12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 3 (OPR3) y acortados por ciclos de β -oxidación, dando como resultado la formación de ácido jasmónico (JA) (Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Strnad, 2018). Además, existe un mecanismo de biosíntesis de JA a partir de dnOPDA que es independiente de OPR3 (Chini et al., 2018). El JA es exportado al citosol donde JASMONIC ACID RESISTANT 1 (JAR1) cataliza la conjugación con isoleucina, para dar la forma biológicamente más activa, el JA-Ile (Staswick & Tiryaki, 2004). Recientemente se describió que la amido sintetasa GRETCHEN HAGEN 3.10 (GH3.10), una enzima de la misma familia que JAR1, también es capaz de conjugarse al JA con isoleucina (Delfin et al., 2022). Finalmente, el JA-Ile ingresa al núcleo, donde ejerce su función regulando la expresión génica (Wasternack & Feussner, 2018; Wasternack & Strnad, 2018) (Fig. 1.3).

En el núcleo, el JA-Ile es percibido por el complejo co-receptor CORONATIVE INSENSITIVE1 (COI1)- JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ). COI1 es una F-box del complejo E3 ubiquitin ligasa SKP1-Cullin-F-box (SCF), que en presencia de JA-Ile interacciona con las proteínas JAZs y las ubiquitina, llevando a su degradación por proteasoma 26S (Howe et al., 2018). Las proteínas JAZs son represoras de la señalización del JA-Ile, interaccionan con las proteínas MYCs y otros factores de transcripción e impiden que ejerzan su función induciendo la expresión génica (Howe et al., 2018). En respuesta al JA-Ile las proteínas JAZs son degradadas, liberando a los MYCs que van a formar homo/heterodímeros y promover la expresión de genes de respuesta al JA-Ile (Howe et al., 2018). En *Arabidopsis* se reportaron 4 proteínas MYCs y 13 proteínas JAZs involucradas en las respuestas al JA-Ile. Si bien existen muchas funciones redundantes entre las proteínas homólogas, también se han descrito roles en respuestas específicas para algunas de ellas, por lo que se cree que las diferentes combinaciones de proteínas JAZs y MYCs permiten ajustar finamente las respuestas al JA-Ile (Fernández-Calvo et al., 2011; Howe et al., 2018; Johnson et al., 2023; Liu et al., 2021; Song et al., 2017) (Fig. 1.3).

Existe un loop negativo en las respuestas al JA-Ile, ya que los genes JAZ aumentan su expresión por la señalización del JA-Ile, evitando una activación desmedida de la vía (Howe et al., 2018; Wasternack & Feussner, 2018). Además, existe un loop positivo, ya que la expresión de los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis y los MYCs es inducida por la misma señalización del JA-Ile (Howe et al., 2018; Wasternack & Feussner, 2018). Sin embargo, el

principal factor que limita la biosíntesis del JA-Ile no es la expresión de enzimas de biosíntesis sino la disponibilidad de precursores (Kimberlin et al., 2022; Scholz et al., 2015). En los últimos años se caracterizaron algunos de los transportadores que permiten la exportación e importación del JA-Ile y sus precursores a los distintos compartimentos celulares, y se vio que tienen un rol importante en la regulación de su biosíntesis y señalización (Li, Yu et al., 2021). También juegan un rol los transportadores del JA desde el citosol al apoplasto, y desde el apoplasto al citosol, que parecen tener una función en las respuestas sistémicas de defensa, permitiendo el transporte de jasmonatos entre células (Li, Yu et al., 2021).

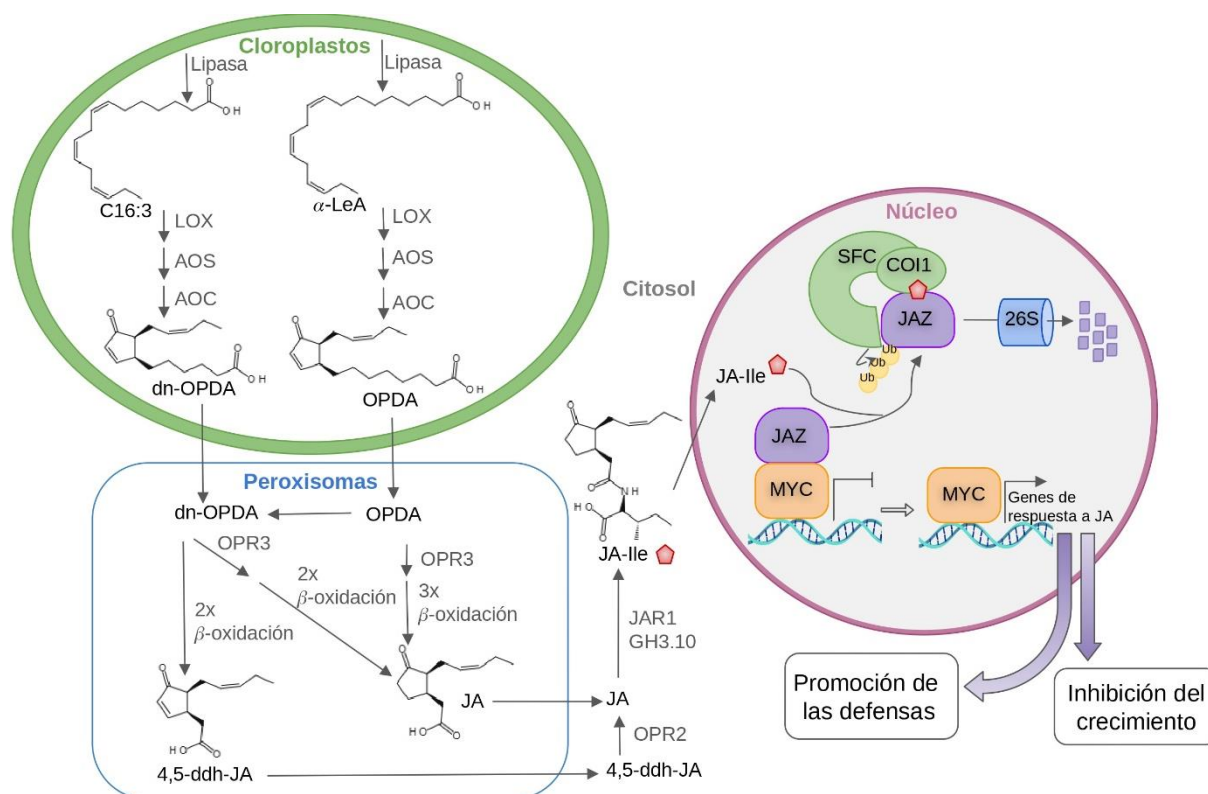


Figura 1.3. Biosíntesis y señalización del JA-Ile. La biosíntesis del JA-Ile comienza en los cloroplastos, con la liberación de ácido linoleico u ácidos grasos hexadecatrienoicos de la membrana por acción de lipasas. Estos ácidos grasos son metabolizados por las enzimas LOX, AOS y AOC, para dar OPDA o dnOPDA respectivamente. Luego, en los peroxisomas el OPDA y dnOPDA son reducidos por la enzima OPR3 y luego acortados por ciclos de β -oxidación (3 ciclos el OPDA y 2 ciclos el dnOPDA), para dar JA. Alternativamente el dnOPDA puede acortarse por dos ciclos de β -oxidación para dar 4,5-dideshidrojasmonato (4,5-ddh-JA), y en el citosol el 4,5-ddh-JA es reducido a JA por OPR2. El JA es conjugado con isoleucina por las enzimas JAR1 y GH3.10, para dar JA-Ile, el jasmonato biológicamente más activo. El JA-Ile ingresa al núcleo donde es percibido por el co-receptor SCF^{COI1}-JAZ, llevando a la ubiquitinización y posterior degradación por proteasoma 26S de las proteínas JAZ. Al degradarse las proteínas JAZ, se liberan los factores de transcripción MYC (y otros factores de transcripción), que van a inducir la expresión de genes de respuesta al JA-Ile. Estos cambios en la expresión génica producen un aumento en las defensas y una inhibición del crecimiento. Figura basada en Heitz, 2021; Wasternack & Strnad, 2018.

Diversidad de jasmonatos

En los últimos años tomaron mayor relevancia los mecanismos de catabolismo e inactivación del JA-Ile, por medio de los cuales se obtiene una diversidad de metabolitos con diferentes

niveles de actividad biológica (algunos de ellos representados en la Fig. 1.4) (Heitz, 2021). El término jasmonatos abarca al conjunto de estos metabolitos, que incluye al JA-Ile y todos los derivados de su catabolismo, así como sus precursores desde el OPDA y sus derivados.

Si bien el JA-Ile es la forma biológicamente más activa, no es la única con actividad. Se reportó que tanto las formas conjugadas con otros aminoácidos no polares (Alanina, Leucina, Valina y Metionina) como la forma oxidada 12-hidroxi-jasmonoil-isoleucina (12-OH-JA-Ile), tienen actividad por la vía canónica de correceptores SCF^{COI1}-JAZs (Fu et al., 2022; Jimenez-Aleman et al., 2019; Poudel et al., 2019; Yan et al., 2016). Además, estos jasmonatos presentan diferente afinidad por correceptores con distintas proteínas JAZ, por lo que se cree que modularían una regulación fina de las respuestas a jasmonatos (Fu et al., 2022; Jimenez-Aleman et al., 2019; Poudel et al., 2019; Yan et al., 2016).

Para otros jasmonatos, como el ácido 12-O-glucopiranosil-jasmónico (12-O-Glc-JA), la cis-jasmona, el jasmonil-triptófano (JA-Trp) y el OPDA, también se reportó actividad biológica, pero por mecanismos independientes de correceptores SCF^{COI1}-JAZs. El 12-O-Glc-JA está involucrado en el movimiento nictinástico de hojas en *Samanea* y *Albizia* (Nakamura et al., 2006, 2011; Yang et al., 2022). En un principio el 12-O-Glc-JA y OH-JA se identificaron como promotores de la formación de tubérculos en papa (y por eso el OH-JA es llamado ácido tuberónico), pero actualmente se cree que esto puede ser un efecto indirecto (Wasternack & Song, 2016). La cis-jasmona es un jasmonato volátil que está involucrado en la comunicación entre plantas, afecta al contenido y composición de los VOCs y promueve las defensas directas e indirectas contra insectos (Ali et al., 2021; Bruce et al., 2008; Matthes et al., 2010). El JA-Trp restringe respuestas a auxinas en raíces al impedir la actividad de una permeasa transportadora de auxinas (Staswick et al., 2017; Staswick, 2009). Sin embargo, los autores concluyen que no parece tener un rol muy relevante, debido a la baja concentración en la que se sintetiza este JA (al menos en las condiciones estudiadas). Se reportaron funciones del OPDA en germinación de semillas, desarrollo de embriones, apertura de estomas, termotolerancia, homeostasis de especies reactivas del oxígeno y defensas contra insectos y patógenos (Jimenez Aleman et al., 2022). Algunos de estos resultados deben ser tomados con cautela ya que es difícil separar las respuestas causadas directamente por el OPDA de las que se generan debido a su metabolismo hacia el JA-Ile, y durante años se utilizaron mutantes *opr3* que luego se describió que son capaces de sintetizar JA-Ile (Chini et al., 2018). En los últimos años se encontraron diversas funciones del OPDA y dnOPDA en briofitas. Estas plantas no sintetizan JA ni JA-Ile, pero conservan el correceptor SCF^{COI1}-JAZ, y la molécula percibida por el mismo es dnOPDA. En estas especies se describieron respuestas del dnOPDA dependientes e independientes de COI1 (Jimenez Aleman et al., 2022).

La expresión de las enzimas que participan en el catabolismo del JA-Ile es inducida por la señalización del JA-Ile, por lo que se propone que el catabolismo forma parte de un loop negativo de regulación. Alteraciones en los niveles de expresión de las enzimas que participan del catabolismo del JA-Ile afectan los niveles de jasmonatos y las respuestas de defensa de las plantas (Caarls et al., 2017; Fernández-Milmanda et al., 2020; Heitz et al., 2012; Koo et al.,

2011; Marquis et al., 2020, 2022; Tang et al., 2020). Trabajos recientes sugieren que la inactivación de los jasmonatos puede ser utilizada por las plantas para regular el fino balance entre los distintos jasmonatos en respuesta a señales ambientales; y contribuiría a la modulación del crecimiento y las defensas (Fernández-Milmanda et al., 2020; Marquis et al., 2020; Widemann et al., 2016; Zhang et al., 2024; Zhu et al., 2021).

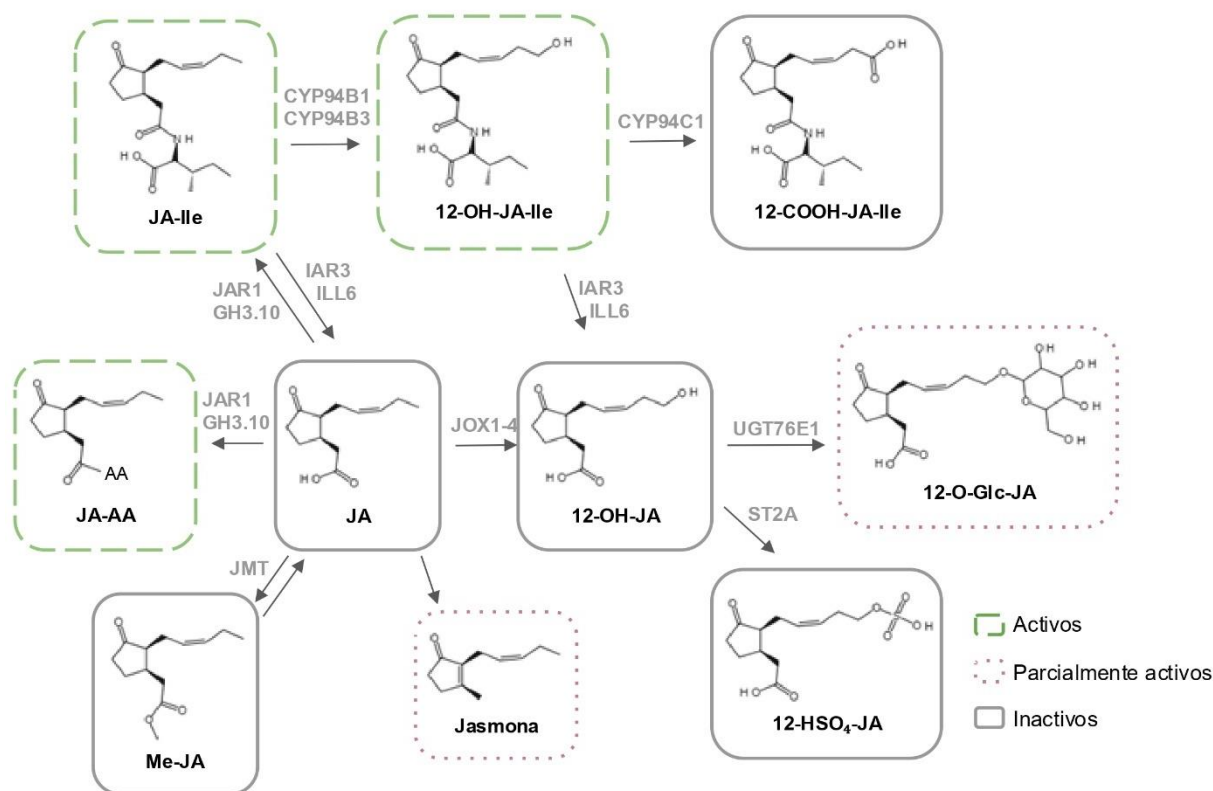


Figura 1.4. El catabolismo del JA-Ile. Se muestran esquemas de algunos de los jasmonatos producto del catabolismo del JA-Ile. Con flechas se indican las reacciones enzimáticas y sobre las mismas se representan las enzimas descritas que catalizan esta reacción. Los jasmonatos bioactivos están recuadrados con línea verde entrecortada (—), los parcialmente activos (se reportó actividad, pero por mecanismos independientes de COI1) con línea rosa punteada (. . .) y los inactivos con línea gris llena (—). El JA-Ile puede ser oxidado por CYTOCHROMES P450 94 B1 (CYP94B1) y CYP94B3 para dar 12-OH-JA-Ile, que a su vez puede volver a ser oxidado por CYP94C1 a 12-carboxi-jasmonil-isoleucina (12-COOH-JA-Ile). Por otro lado, el JA-Ile y 12-OH-JA-Ile pueden ser deconjugados por las amidohidrolasas IAA-ALANINE RESISTANT 3 (IAR3) e IAA-AMINO ACID HYDROLASE ILR1-LIKE 6 (ILL6) para dar JA o ácido tuberónico (12-OH-JA). A su vez el JA puede ser oxidado por las JASMONATE-INDUCED OXYGENASE (JOX/JAO) para dar 12-OH-JA. El 12-OH-JA es tanto sustrato de SULFOTRANSFERASE 2a (ST2a), que cataliza la formación de un sulfo-jasmonato (12-HSO₄JA), como de UDP-DEPENDENT GLYCOSYLTRANSFERASE 76E1 (UGT76E1), que cataliza la formación de ácido 12-O-glucopiranosil-jasmónico (12-O-Glc-JA). El JA puede ser metilado, descarboxilado o conjugado con otros aminoácidos además de isoleucina. Me-JA = metil-jasmonato, JA-AA = jasmonoil-aminoácido (aminoácidos descriptos: alanina, valina, leucina, metionina, triptófano), JMT = JASMONATE O-METHYLTRANSFERASE. Figura adaptada de Heitz, 2021; Wasternack & Strnad, 2018.

ST2a en el balance entre el crecimiento y las defensas

La enzima SULFOTRANSFERASE 2a (ST2a) participa en el catabolismo del JA-Ile, catalizando la formación de 12-HSO₄JA a partir de 12-OH-JA (Fernández-Milmanda et al., 2020; Gidda et al.,

2003). Al igual que otras enzimas que participan en el catabolismo de los jasmonatos, la expresión de *ST2a* es inducida por la vía del JA-Ile (Fernández-Milmanda et al., 2020). Además, la expresión de *ST2a* se induce en respuesta a tratamientos lumínicos que simulan competencia (aumento del RL lateral), por medio de los PIFs (Fernández-Milmanda et al., 2020). Cuando las plantas son expuestas a señales lumínicas de competencia, la inactivación de jasmonatos mediada por *ST2a* restringe el aumento en el pool de jasmonatos bioactivos en respuesta a atacantes, llevando a una disminución en la expresión de marcadores del JA-Ile y en la capacidad de las plantas de defenderse frente a herbívoros y patógenos necrótrofos (en comparación a plantas que no fueron expuestas a señales lumínicas de competencia) (Fernández-Milmanda et al., 2020). Plantas mutantes *st2a-1* resultaron ser más resistentes contra patógenos necrótrofos e insectos herbívoros particularmente en condiciones de bajas relaciones R/RL (Fernández-Milmanda et al., 2020). Por lo tanto, la vía de *ST2a* es un mecanismo molecular novedoso que explica cómo en respuesta a un ambiente lumínico que simula competencia, disminuyen las respuestas de defensa de las plantas (Fernández-Milmanda et al., 2020) (Fig. 1.5). Además, plantas mutantes *st2a-1* crecen en forma similar a las plantas salvajes en condiciones control, pero, bajo condiciones de inducción de los jasmonatos, responden menos a tratamientos lumínicos que simulan competencia que las plantas salvajes (en cuanto a respuestas de SAS) (Fernández-Milmanda et al., 2020).

Existen otros trabajos que proponen la inactivación de jasmonatos por la vía de *ST2a* como un mecanismo que utilizan las plantas para promover el crecimiento y el fenotipo de SAS, en respuesta a señales ambientales. Por un lado, se vio que plántulas de *Arabidopsis* activan la expresión de *ST2a* y *JASMONATE-INDUCED OXYGENASE (JOX)* en respuesta a temperaturas cálidas para permitir la elongación del hipocotilo; y plántulas de trigo acumulan más 12-HSO₄-JA y menos JA-Ile (Zhu et al., 2021). Por otro lado, se describió en plántulas de *Arabidopsis* que la expresión de *ST2a* es regulada por el reloj circadiano, por medio de los PIFs, y su expresión aumenta particularmente al final de la noche en fotoperíodos de día corto, momento en el cual también aumenta la elongación del hipocotilo (Yamashino et al., 2013).

Otros mecanismos involucrados en el balance crecimiento-defensas

Además de la inactivación de jasmonatos por la vía de *ST2a*, existen otros mecanismos que contribuyen a la atenuación de las defensas mediadas por jasmonatos en respuesta a la sombra (Fig. 1.5). Está reportado que condiciones de sombra simulada desestabilizan a las proteínas MYCs, lo que contribuye a atenuar las defensas (Chico et al., 2014). Por otro lado, la inactivación del phyB por bajas relaciones R/RL promueve la acumulación de giberelinas (GAs), al menos en parte al inducir la expresión de sus genes de biosíntesis (Bou-Torrent et al., 2014; Hisamatsu et al., 2005). Las GAs regulan respuestas de escape al sombreado, promoviendo un alargamiento de hipocotilos y tallos (Küpers et al., 2020; Yang & Li, 2017). Las proteínas DELLAs son represores de las respuestas a GAs e interaccionan con los PIFs y con las JAZs (De Lucas et al., 2008; Hou et al., 2010). Las GAs llevan a la degradación por proteasoma de las proteínas DELLAs, liberando así a los PIFs (y permitiendo que promuevan

la expresión de genes de respuesta al sombreado, entre ellos genes de biosíntesis de IAA y a las JAZs, que van a reprimir la expresión de las defensas mediadas por jasmonatos (Hou et al., 2010; Leone et al., 2014). Recientemente se ha descrito un mecanismo independiente de las GAs que desestabiliza las DELLAs en respuesta a la sombra y posiblemente también contribuya en la liberación de proteínas JAZs (Blanco-Touriñán et al., 2020) (Fig. 1.5). También está reportado que los fitocromos interactúan con JAR1 (enzima que conjuga JA con Ile), regulando su actividad (Jiang et al., 2023; Peng et al., 2023; Swain et al., 2017).

El balance DELLAs-JAZs también explica, al menos en parte, la represión a las respuestas de escape al sombreado que ejerce la vía del JA-Ile. En respuesta al ataque de consumidores aumenta el JA-Ile y se degradan las proteínas JAZs, liberando a las DELLAs, lo que lleva a reprimir el crecimiento (Leone et al., 2014; Pierik & Ballaré, 2021; Yang et al., 2012). Por otro lado, la menor disponibilidad de JAZs también contribuiría a restringir el crecimiento, ya que las JAZs atenúan la expresión de *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1)* y *PAR2*, represores de los PIFs (Liu, Wei et al., 2019). En plántulas de *Arabidopsis*, se describió que los MYCs restringen la elongación del hipocotilo al inducir la expresión de *ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5)*, factor de transcripción central en la fotomorfogénesis (Ortigosa et al., 2020). En plantas adultas los MYCs también parecen restringir la elongación del pecíolo de manera independiente de los PIFs, aunque se desconoce el mecanismo molecular (Li et al., 2020). Recientemente se reportó que la señalización de los jasmonatos, en *Arabidopsis* y arroz, promueve el catabolismo de las GAs e inhibe su biosíntesis, evidenciando nuevos mecanismos moleculares por los cuales los jasmonatos contribuyen a atenuar el crecimiento (Fukazawa et al., 2023; Jin et al., 2023; Wang et al., 2023). Por otro lado, se propone que los metabolitos secundarios de defensa (y sus derivados) pueden afectar directamente al crecimiento, sumando un nivel más en la regulación del balance crecimiento-defensas (Malhotra et al., 2023).

Además, existen loops negativos de regulación que impiden una activación desmedida de las respuestas a sombra y a atacantes. Por ejemplo, la inactivación del phyB promueve la expresión de distintos represores de los PIFs, mientras que los MYCs promueven la expresión de JAZs y *ST2a* (además de los genes que codifican para otras enzimas del catabolismo del JA-Ile). Por otro lado, está reportado que los MYCs pueden inducir la expresión de genes de biosíntesis de IAA (Machado et al., 2016; Pérez-Alonso et al., 2021). Pareciera ser que, dependiendo del contexto ambiental y la respuesta estudiada, las vías de jasmonatos e IAA pueden funcionar de forma antagónica o sinérgica (Naseem et al., 2015). La regulación a nivel molecular del balance entre crecimiento y defensas es sumamente compleja y, pese a los grandes avances de los últimos años, aún no la conocemos por completo. La complejidad de esta red posiblemente explique el hecho de que al manipular las defensas de las plantas no siempre se detecta un antagonismo claro sobre el crecimiento, sino que parece depender de la interacción del mecanismo estudiado con otras vías de regulación de la planta, y del contexto ambiental (Fernández-Milmanda et al., 2020; Hu et al., 2013; Meldau et al., 2012; Tang et al., 2020; Zhang et al., 2024).

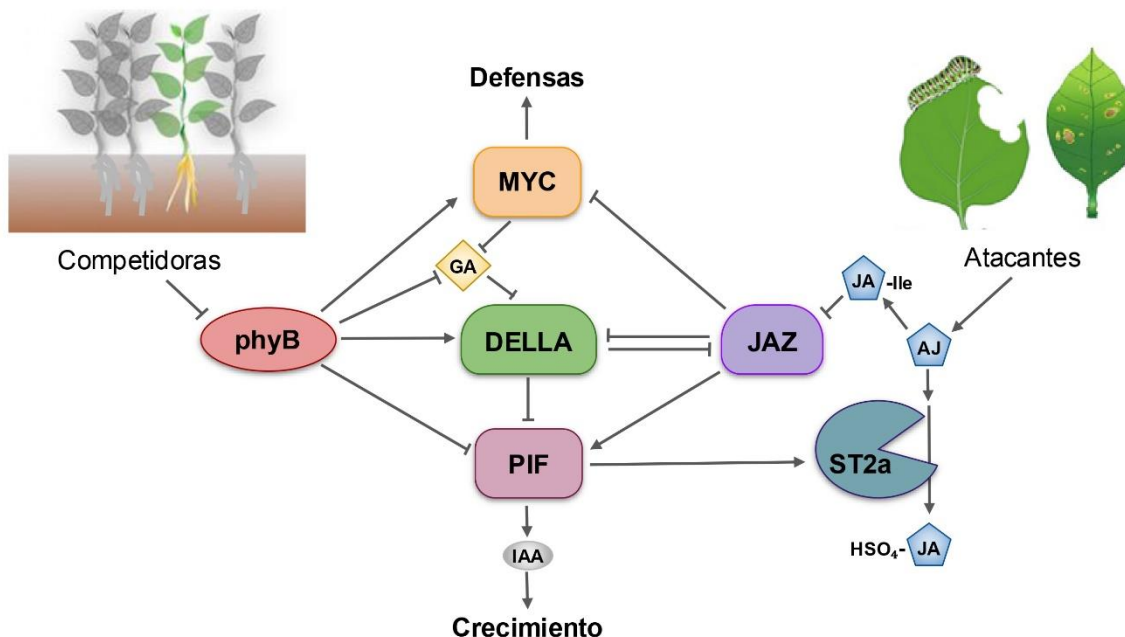


Figura 1.5. Conexiones moleculares entre el crecimiento y las defensas. Esquema simplificado de los vínculos moleculares entre el crecimiento en respuesta a competidoras y la inducción de mecanismos de defensa en respuesta a atacantes. Señales lumínicas de competencia inactivan al phyB, liberando a los PIFs, factores de transcripción que promueven la biosíntesis de auxinas y el crecimiento. A su vez los PIFs inducen la expresión de ST2a, enzima involucrada en el catabolismo del JA-ile que reduce el pool de jasmonatos bioactivos, atenuando así las respuestas de defensa. Por otro lado, la inactivación de phyB lleva a una mayor acumulación de GA, que degradan a las DELLAs, liberando a las proteínas represoras JAZs. Una mayor disponibilidad de JAZs va a generar una mayor represión de los genes regulados por MYCs, atenuando así las defensas. La inactivación del phyB reduce la estabilidad de los MYCs lo que también contribuye a la atenuación de las defensas. En respuesta a la presencia de insectos herbívoros y patógenos necrótrofos aumentan los niveles de JA-Ile. El JA-Ile lleva a la degradación de las JAZs, liberando a los MYCs, factores de transcripción que inducen respuestas de defensa y atenúan la acumulación de GAs, reprimiendo así el crecimiento. Por otro lado, la degradación de las JAZs va a llevar a una menor disponibilidad de PIF (de manera dependiente e independiente de las DELLAs), lo que también contribuye a reducir el crecimiento. Las flechas (->) indican una regulación positiva (inducción, estabilidad, activación); mientras que las líneas troncadas (-|) indican una regulación negativa (represión, degradación, inactivación). Figura basada en Fernández-Milmanda & Ballaré, 2021.

Implicancias del antagonismo crecimiento-defensas en cultivos

En sistemas productivos, una mayor activación de los mecanismos de defensas naturales de las plantas podría incrementar la sanidad de los cultivos. Sin embargo, debido a sus costos sobre el crecimiento y a su menor eficacia (a corto plazo) en la eliminación de atacantes en comparación al uso de pesticidas, no se ha expandido el uso de las defensas naturales de las plantas. En los últimos años, la búsqueda de formas de producción de alimentos más amigables con el ambiente y con la sociedad, vuelve a poner atención en la promoción de mecanismos de defensas naturales como una herramienta más dentro de un manejo integrado de plagas (Bruce et al., 2017; Yassin et al., 2021). Algunas de las estrategias que se

han propuesto con el objetivo de promover las defensas de las plantas sin afectar la productividad son el “priming” y el uso de microorganismos benéficos (que pueden promover el crecimiento de las plantas y a la vez producir metabolitos de defensa). El “priming” consiste en exponer a las plantas a moléculas inductoras, que no llevan a una activación per se de las defensas (y por lo tanto no implican grandes costos en el crecimiento), pero causan que las plantas produzcan una respuesta de defensas más intensa/rápida al ser expuestas a atacantes (Buswell et al., 2018; Sestari & Campos, 2022).

Por otro lado, los costos en cuanto al crecimiento y la habilidad competitiva de las plantas producto de una mayor activación de las defensas no necesariamente van a reducir el rendimiento en un cultivo. Por el contrario, hace décadas Donald planteó que el ideotipo que maximiza el rendimiento por unidad de área de un monocultivo es el de plantas con baja habilidad competitiva (Donald, 1968; Donald & Hamblin, 1983). En sintonía con este ideotipo, trabajos recientes encuentran que una reducción en las respuestas a la competencia trae ventajas sobre el rendimiento de distintos cultivos (Cossani & Sadras, 2021; Lake et al., 2016; Pantazopoulou et al., 2021; Wuest et al., 2022; Zhai et al., 2021). Las respuestas de escape al sombreado que los individuos muestran son ventajosas cuando compiten con vecinas menos sensibles a la sombra, pero no van a mejorar su posición en el cultivo si sus vecinas presentan las mismas respuestas; por el contrario, pueden traer desventajas (por ejemplo, mayor susceptibilidad al vuelco). De hecho, en la actualidad, se buscan seleccionar variedades cooperativas (que maximizan la producción por unidad de área) y no competitivas (que maximizan la producción por planta) (Biernaskie, 2022; Wuest et al., 2022).

En este contexto, comprender la regulación de las defensas naturales de las plantas y los efectos que tiene una mayor activación de estos mecanismos de defensa sobre la resistencia frente a distintos atacantes, el crecimiento y el rendimiento en un ambiente de competencia, puede contribuir al diseño de nuevas estrategias de mejoramiento y/o manejo de cultivos.

La inactivación de jasmonatos por la vía de ST2a parece jugar un rol clave en la modulación del balance entre crecimiento y defensas en respuesta a señales lumínicas que simulan competencia. Plantas mutantes *st2a-1* son incapaces de responder a un aumento del RL lateral atenuando el pool de jasmonatos bioactivos, lo que lleva a que resulten ser más resistentes a patógenos y herbívoros que las plantas salvajes (en ambientes lumínicos que simulan competencia), pero no presentan penalidades obvias sobre el crecimiento (Fernández-Milmanda et al., 2020). Dado que en sistemas productivos se suelen utilizar altas densidades de siembra, podemos pensar que plantas incapaces de inactivar jasmonatos por esta vía podrían aumentar la sanidad del cultivo, si este mecanismo se encontrara conservado en especies de interés agrícola. Sin embargo, hasta el momento desconocemos si plantas *st2a-1* son más resistentes a atacantes que las plantas salvajes cuando se encuentran compitiendo con plantas vecinas. Tampoco sabemos cuáles son los costos de la falta de ST2a en cuanto al crecimiento y la producción de frutos en este contexto.

Objetivos e hipótesis

El objetivo general de esta tesis es avanzar en la comprensión del rol que tiene el catabolismo de los jasmonatos en el balance entre crecimiento y defensas.

Nuestro objetivo específico es estudiar la relevancia del mecanismo de inactivación de jasmonatos por la vía de ST2a en condiciones de competencia en cuanto a 1) las defensas contra patógenos y herbívoros y; 2) el crecimiento, la habilidad competitiva y el éxito reproductivo.

En línea con el objetivo específico, se plantearon las siguientes hipótesis, que fueron evaluadas a lo largo de este trabajo.

Hipótesis:

- 1) En condiciones de competencia, la inactivación de jasmonatos por medio de ST2a restringe las defensas contra patógenos y herbívoros.
- 2) En condiciones de competencia, la inactivación de jasmonatos por medio de ST2a es relevante para promover el crecimiento y la habilidad competitiva.
- 3) La relevancia de ST2a sobre el éxito reproductivo en condiciones de competencia depende de la presencia de atacantes y de la capacidad de inactivar jasmonatos que tengan las plantas competidoras.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Todos los experimentos se realizaron con plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Se utilizaron plantas salvajes ecotipo Columbia (Col-0) y mutantes *st2a-1*, que se encuentran en un fondo genético ecotipo Columbia (Fernández-Milmanda et al., 2020).

Las semillas se sembraron en recipientes plásticos con tierra de jardín (sustrato profesional exterior, Hi-Soil), se cubrieron con film y se dejaron 72 h en oscuridad a 4°C. Luego se colocaron a la luz en un invernadero. A la semana de ser expuestas a la luz, las plántulas se trasplantaron a macetas N14 (capacidad 1.2 L) con una mezcla de tierra (sustrato profesional exterior, Hi-Soil): Perlita 10:1 y se fertilizaron con N16-P7-K15 (Floranid Tween Permanent, Floranid®) (1gr fertilizante/litro de sustrato). Las macetas se colocaron al azar sobre una mesada del invernadero. Los experimentos fueron realizados de Abril a Octubre, en las instalaciones del IFEVA, situado a -34.591069° latitud y -58.479283° longitud. En días soleados, al mediodía, la irradiancia medida alcanzó los 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El invernadero cuenta con calefacción por radiadores de agua caliente y refrigeración por circulación forzada de aire enfriado con agua. El control de temperatura está ajustado entre los 10°C (se enciende la calefacción) y los 25°C (se enciende la circulación de aire enfriado).

Las plantas se distribuyeron en distintas densidades, sin competencia (1 planta por maceta) y con competencia (4 u 8 plantas por maceta según se especifique en cada experimento) (Fig. 2.1.A). Se realizaron experimentos bajo competencia en monocultivo, que consistió en macetas con todas las plantas del mismo genotipo (Col-0 o *st2a-1*), y en cultivos mixtos, que consistió en macetas con ambos genotipos dispuestos de forma intercalada (Fig. 2.1.B).



Figura 2.1. Diseño experimental. A) Fotografía de macetas sin y con competencia (1 y 4 planta por maceta). B) Fotografías de macetas en cultivo mixto y monocultivo.

Cuantificación de fitohormonas

La cuantificación de fitohormonas se llevó a cabo en dos experimentos independientes. En el primer experimento se utilizaron macetas con dos densidades de siembra distintas (1 y 4 plantas por maceta) y se compararon los genotipos Col-0 y *st2a-1*. La mitad de las macetas fueron sometidas a un tratamiento de cepillado, con el objetivo de generar un aumento en los jasmonatos. Este tratamiento consistió en pasar un pincel suavemente sobre cada roseta 5 veces, y el procedimiento se repitió una vez al día durante 11 días. La cosecha se realizó una hora después del último tratamiento con el pincel, cuando las plantas tenían 6 semanas de edad. En el segundo experimento se buscó incrementar la intensidad de la competencia. Este tratamiento de competencia consistió en sembrar 8 plantas por maceta, 4 plantas en los bordes y 4 plantas en el centro. Estas últimas fueron utilizadas al momento de la cosecha, cuando tenían 5 semanas de edad. Para ambos experimentos el tratamiento de competencia se realizó en monocultivo y cada réplica consistió en un pool de 3 rosetas (para condiciones de competencia provenientes de una misma maceta), que fueron cosechadas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su liofilización.

La extracción y cuantificación por LC-MS/MS se realizó en colaboración con los laboratorios de Jonathan Gershenzon (Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena), siguiendo el protocolo descrito en Fernández-Milmanda et al., 2020.

Cuantificación de metabolitos de defensa

Se utilizaron macetas con distintas densidades (1 y 4 plantas por maceta, en monocultivo) y genotipos (Col-0 y *st2a-1*) y se cosecharon plantas de 6 semanas de edad. Cada réplica consistió en un pool de 3 rosetas, que fueron cosechadas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su liofilización.

Las antocianinas se cuantificaron por espectrofotometría, a partir de extractos foliares. Se pulverizó el tejido liofilizado y se realizó la extracción de pigmentos con metanol ácido, siguiendo el protocolo descrito en Neff & Chory, 1998, con modificaciones menores. Se pesaron 8 mg de tejido liofilizado a los que se le agregó 1 ml de MeOH:HCl 1% y se dejó durante 24hs a 4 °C en oscuridad. Luego se tomaron 400 µl y se realizó una extracción de las clorofilas con 700 µl de cloroformo:H₂O (4:3). La fase acuosa se utilizó para medir la absorbancia a 530 y 657 nm por espectrometría. Se analizó la diferencia entre la absorbancia a 530 y 657 nm por mg de tejido liofilizado.

Los Glucosinolatos se extrajeron y cuantificaron siguiendo el protocolo descrito en Cargnel et al., 2014. Se agregaron 1.2 ml de metanol 70% a microtubos con 15 mg de tejido liofilizado molido. Los microtubos se incubaron 5 min a 70°C, luego fueron centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos y se colectó el sobrenadante. Se agregaron 0.125 µmoles de sinigrina como estándar interno. Se repitió la extracción otras dos veces y los sobrenadantes fueron combinados. Los sobrenadantes se transfirieron a columnas de DEAE-Sephadex A-25 (previamente equilibradas con metanol 70%). Los glucosinolatos retenidos en la columna se

desulfataron incubando las columnas con una solución de arilsulfatasa durante una noche a temperatura ambiente. Luego, los desulfoglucosinolatos fueron eluidos de la columna con agua miliQ. Los desulfoglucosinolatos fueron cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna Restek Pinnacle II C18 (5 μ m, 4.6 x 150 mm), con los solventes A (agua miliQ) y B (acetonitrilo 20%), eluidos con un gradiente de 1% B a 0 min, 10% B a 10 min, 75% B a 22-24 min, con un tiempo de equilibración de 10 min y un flujo de 1 ml min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 μ l, y la elución fue monitoreada con un detector de arreglo de diodos a una λ de 229 nm. 4-metilsulfonilbutil (4MSOB), 3-metilsulfonilpropilo (3MSP) e indol-3-il-metil (I3M) fueron identificados en función de sus tiempos de retención relativa y sus espectros de absorción UV. Para calcular la concentración de los glucosinolatos, se utilizaron factores de corrección por las diferencias en la eficiencia de extracción entre el estándar interno y los otros compuestos (Brown et al., 2003).

Expresión génica

Se realizaron 3 experimentos independientes. En los primeros dos se cuantificaron únicamente plantas Col-0 y en el tercero se compararon plantas Col-0 y *st2a-1*. Se utilizaron macetas con distintas densidades (1 y 4 plantas por maceta, en monocultivo) y se cosecharon plantas de 6 semanas de edad. Cada réplica consistió en un pool de 3 rosetas, que fueron cosechadas en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su utilización.

Las rosetas se pulverizaron a mano en un mortero con nitrógeno líquido y aproximadamente 100 mg del polvo fue utilizado para extraer ARN con Bio-Zol (P-BL), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la absorbancia de la muestra a 230, 260 y 280 nm para determinar la concentración de ARN y detectar contaminaciones. Posibles contaminaciones con ADN fueron eliminadas de las muestras por medio del tratamiento con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega). El ADNc fue obtenido con la M-MLV Reverse Transcriptasa (Promega) a partir de 1ng de ARN, siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADNc fue realizada en un equipo 7500 real-time (Applied Biosystems), siguiendo los protocolos estándar y utilizando FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Merck). *IPP2a* (AT3G02780) y *UBC21* (AT5G25760) fueron considerados genes de referencia ya que su expresión no fue afectada por nuestros tratamientos ni varió en los diferentes genotipos. La expresión relativa fue calculada utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La eficiencia de amplificación de los *primers* utilizados fue estimada con el programa LinRegPCR (Heart Failure Research Center), y en todos los casos se obtuvo una eficiencia entre 1.87 y 2. Las secuencias de los *primers* utilizados se muestran en la Tabla 1.

Gen	Primer 1	Primer 2
<i>PIL1</i>	AAGACGACCTACGATGTTGCCAATG	GTAGCCTGAGTCTGAGAAACACACG
<i>ATHB2</i>	ATGAGCCCACTACTTTGAC	CAGGCGCCACGCATTGACC
<i>HFR1</i>	ACGTCGTATCCAGGTCTTAAGT	GAGAACCGAAACCTTGTCCG
<i>IAA2</i>	TAGAGCAGGAGCGTCGGATC	ATGGTGACTGGATGTTGGTTGG
<i>ST2a</i>	CTGAGGGCCTACTATATACG	CGACAAACTTCGGTGTGAC
<i>AOC4</i>	ATCCACCACTTCCTCCACTG	CGGTGATTCCTATGCGTTTT
<i>JAZ1</i>	GCCAATCCAATCCTCCCCAA	GGGTTTGAAGACGCTTTGGC
<i>MYC2</i>	CCGAAAACCGAATCTGGAT	GGGTCTGAGAATGAACCGGAC
<i>VSP2</i>	CGTCGATTCGAAAACCATCT	GGCACCGTGTCGAAGTCTAT
<i>PDF1.2</i>	TTGCTGCTTTCGACGCA	TGTCCCACTTGCTTCTCG
<i>IPP2A</i>	ATGGTTCAGATTGGTGGTGGAC	AAAGATGTTGAGAGTTTGTGGATGG
<i>UBC</i>	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTA	TTGTGCCATTGAATTGAACCC

Tabla 1 Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como *primers* en las PCRs en tiempo real.

Bioensayos con *Botrytis cinerea*

Se cultivó y mantuvo la cepa de *B. cinerea* (cepa B05) en agar papa-dextrosa (1.5% agar, 2% extracto de papa, 2% dextrosa). Los conidios se colectaron desde las placas de agar con una solución de sacarosa 0.1M / KH₂PO₄ 0.07M y fueron filtrados.

Se realizaron 4 bioensayos independientes infectando con gota. En los primeros 3 experimentos se infectaron macetas en competencia en monocultivo, con 4 plantas por maceta, y se utilizaron plantas de 4 semanas de edad. La infección se realizó colocando una gota de 5 µl con una suspensión de esporas de *B. cinerea* sobre las 4 hojas más jóvenes completamente expandidas de cada planta (Fig 2.2.A). En los distintos experimentos se probaron diferentes concentraciones de esporas (se utilizó una concentración de 4×10^5 , 6.5×10^5 y 1.2×10^6 conidios ml⁻¹ en los experimentos 1, 2 y 3 respectivamente). En el 4to experimento se aumentó la intensidad de la competencia, utilizando monocultivos con 8 plantas por maceta, y plantas de 5 semanas de edad. La infección se realizó siguiendo el mismo protocolo que en los experimentos anteriores, con una suspensión de esporas de *B. cinerea* a una concentración de 4×10^5 conidios ml⁻¹. En todos los experimentos, para mantener la humedad y generar un ambiente propicio para el hongo, las macetas se cubrieron con tapas de plástico con pequeños agujeros (Fig. 2.2.A-B). Entre las 48 y 72hs luego de colocar la suspensión de esporas sobre las hojas, se cosecharon las hojas infectadas y se tomaron fotografías de la cara abaxial (Fig 2.2.C). El área dañada por el patógeno se cuantificó con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems).

En el bioensayo por asperjado, se rociaron plantas de 4 semanas en cultivo mixto con una suspensión de esporas de *B. cinerea* (4×10^5 esporas ml⁻¹, 7.5 ml /maceta). Para mantener la

humedad y generar un ambiente propicio para el hongo, las macetas se cubrieron con tapas de plástico con pequeños agujeros (Fig. 2.2.B). A los 5 días se tomaron fotografías y se cuantificó el área total expuesta por cada genotipo y el área dañada por *B. cinerea* con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems) (Fig. 2.2.D). Como las plantas *st2a-1* difieren de las Col-0 en el área expuesta, se cuantificó el % de área dañada para cada genotipo.

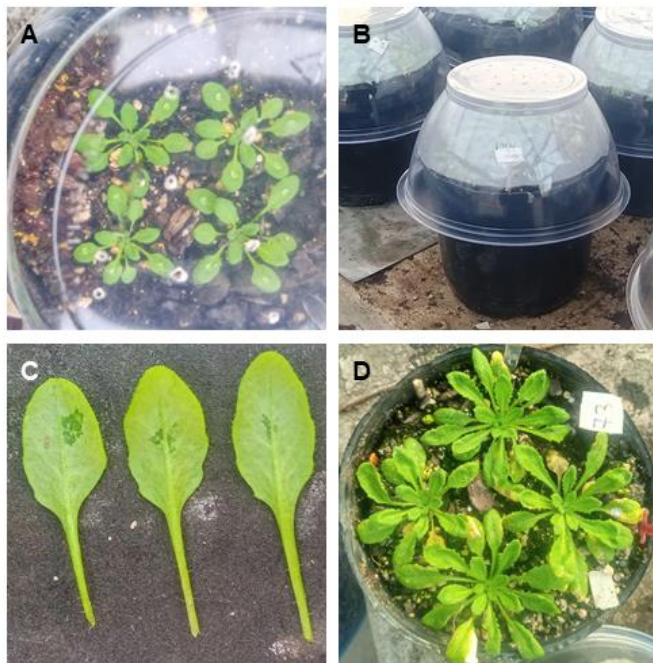


Figura 2.2. Fotografías de bioensayos con *B. cinerea*. A) Se muestra una maceta al inicio de la infección con *B. cinerea*. Se pueden observar las gotas que contienen la suspensión de esporas sobre las hojas. B) Se muestran macetas cubiertas con las tapas de plástico con pequeños agujeros que mantienen un ambiente húmedo, propiciando el desarrollo de la infección. C) Hojas infectadas con una gota de suspensión de esporas al momento de la cosecha, donde se ven las lesiones causadas por *B. cinerea* (de un verde más oscuro). D) Maceta que fue rociada con una suspensión de esporas donde se identifican lesiones necróticas causadas por *B. cinerea* (sectores amarillos/marrones de las hojas).

Experimentos con *Spodoptera frugiperda*

Los insectos (*S. Frugiperda*) fueron criados a lo largo de su ciclo de vida en nuestro laboratorio. Las larvas fueron alimentadas con una dieta artificial a base de harina de soja, garbanzo, salvado y levadura de cerveza. Los ejemplares adultos fueron alimentados con una solución de melaza. Se recolectaron las puestas de huevos y las larvas fueron utilizadas para los experimentos de herbivoría.

Se realizaron dos experimentos independientes, ambos en cultivos mixtos. Las plantas crecieron en el invernadero y a las 6 (primer experimento) o 4 semanas (segundo experimento), se asignaron al azar la mitad de las macetas al tratamiento con herbivoría y la otra mitad al tratamiento control. Las macetas fueron trasladadas a mini invernaderos de PVC, con dos paredes de tela para permitir una mayor circulación de aire (Fig. 2.3.A). En un mini invernadero se colocaron las macetas sometidas a herbivoría y en otro mini invernadero las macetas control. Ambos mini invernaderos se dispusieron contiguos en el campo

experimental del IFEVA y fueron cubiertos con mediasombra para evitar un aumento excesivo de la temperatura y la intensidad de luz solar (Fig. 2.3.A). En las macetas con tratamiento de herbivoría se colocaron un total de 25 larvas estadio 2 por planta (se agregaron 5 larvas por planta cada 3 días) (Fig. 2.3.D). Las larvas pueden moverse libremente entre plantas y entre macetas y fueron creciendo y cambiando de estadio a lo largo del experimento (Fig. 2.3.E).

El % de área removida por herbivoría se cuantificó a partir de fotografías, tomadas durante las primeras dos semanas luego de colocar las larvas (Fig. 2.3.B-C). La cuantificación se realizó con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems).

Al final del experimento (plantas de 10 y 9 semanas en los experimentos 1 y 2 respectivamente), se cosecharon los frutos producidos por cada planta, se secaron en estufa a 60°C por 48hs y se tomó el peso seco en una balanza de precisión. Se analizó la biomasa total de frutos por maceta y la relación entre la biomasa de frutos producida por *st2a-1* y por sus vecinas Col-0, para cada maceta.

La edad cronológica de las plantas al tiempo de cosecha en estos experimentos fue menor que en los otros experimentos en los que se evaluó la producción de frutos. Esto se debe a que los experimentos de herbivoría fueron sembrados hacia el final de la temporada invernal (en agosto), ya que las larvas de *S. frugiperda* no se desarrollan bien con temperaturas bajas. A esta altura del año las plantas de *Arabidopsis* florecieron a una menor edad cronológica que en los otros experimentos donde se cuantificó la producción de frutos (sembrados entre abril y junio).

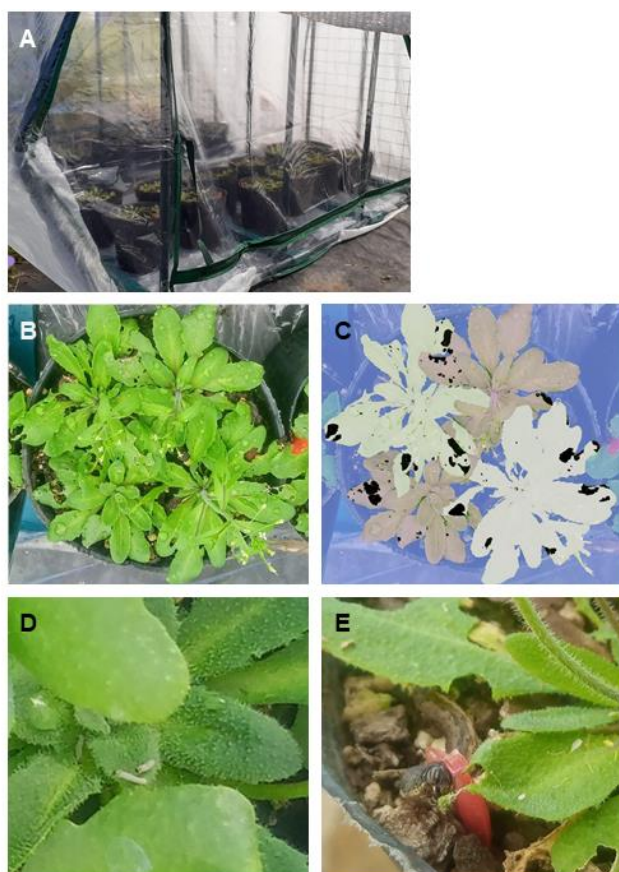


Figura 2.3. Fotografías de bioensayos con *S. frugiperda*. A) Mini invernaderos con macetas. B) Maceta expuesta por dos semanas a larvas de *S. frugiperda*, puede identificarse la remoción del tejido foliar causado por la herbivoría. C) Misma fotografía que en (B), donde se colorearon con negro las lesiones causadas por las larvas, con blanco las plantas Col-0 y con rosa las plantas *st2a-1*. D) Larvas de estadio 2, al comenzar el tratamiento de herbivoría. E) Larva de estadio 6, 25 días luego de comenzado el tratamiento de herbivoría.

Parámetros de crecimiento y productividad

En un primer experimento se evaluó el área y la biomasa de las rosetas, bajo competencia en monocultivo. El área de las rosetas se cuantificó en plantas de 4 semanas de edad, a partir de fotografías, con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems). Para cuantificar la biomasa, las rosetas de plantas de 6 semanas de edad fueron cosechadas, se secaron en estufa a 60°C por al menos 48 hs y se tomó el peso seco en una balanza de precisión.

En un segundo experimento se cuantificaron el área expuesta a PAR directo, la altura de las plantas y la biomasa de frutos, bajo competencia en cultivos mixtos. El área de exposición directa al PAR fue medida a las 5 y 6 semanas de edad, a partir de fotografías, con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems). La altura de la inflorescencia principal se midió con metro, a las 14 semanas de edad. Cuando las plantas llegaron a las 16 semanas de edad, se cosecharon los frutos, se secaron en estufa a 60°C por al menos 48hs y se tomó el peso seco en una balanza de precisión.

En un tercer experimento se midieron la relación lámina:pecíolo, el área de las rosetas, la altura de las plantas y el número y la biomasa de frutos, en condiciones de monocultivo y cultivo mixto. El área de las rosetas y la relación lámina:pecíolo se midió en plantas de 5 semanas de edad, a partir de fotografías, con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems). La altura de la inflorescencia principal se midió con metro, en plantas de 12 semanas. Cuando las plantas alcanzaron las 15 semanas de edad, se contó el número de frutos de cada planta, y luego los frutos fueron cosecharon, secaron en estufa a 60°C por al menos 48hs y se tomó el peso seco en una balanza de precisión.

Se realizaron otros tres experimentos en los cuales se cuantificó la altura de las plantas y la biomasa de frutos producida, en condicione de monocultivo y cultivo mixto. La cosecha de los frutos se realizó en plantas de 16, 14 y 12 semanas de edad.

Las diferencias en la edad cronológica de las plantas entre temporadas posiblemente se deban a diferencias en las fechas de siembra y a diferencias ambientales entre temporadas (por ejemplo, diferencias en la temperatura). La cosecha de frutos se realizó durante 3 días consecutivos, siempre tomando macetas al azar.

Análisis estadístico

Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron en R versión 4.0.5 (R Core Team, 2021, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Cuando se compararon dos grupos se realizaron tests t-Student, tests t-Student pareado (cuando se comparan los dos genotipos en competencia mixta) o tests t-Welch (cuando la varianza entre los dos grupos no fue homogénea). Se utilizó el promedio del genotipo para cada maceta, para tener todos datos independientes (macetas en monocultivo) o pareados (en el caso de macetas mixtas).

En los experimentos donde se comparan los dos genotipos (Col-0 vs *st2a-1*) a dos densidades distintas (1 vs 4 o 1 vs 8 plantas por maceta), se realizaron ANOVAs de dos factores. Se utilizó el promedio de cada maceta, para tener todos datos independientes. Cuando fue necesario, la función 'weights = varPower', del paquete "NLME" se utilizó para modelar la varianza. Cuando la interacción fue significativa, las diferencias entre grupos se establecieron por un test de Tukey, utilizando el paquete "Multcomp".

Se realizaron modelos mixtos para el análisis conjunto de más de un experimento (utilizando el paquete "NLME"), donde el experimento se incluyó como factor aleatorio. También se utilizaron modelos mixtos en los experimentos con el factor "tipo de competencia" (monocultivo vs cultivo mixto), donde la maceta se incluyó como factor aleatorio. Cuando fue necesario, la función 'weights = varPower' se utilizó para modelar la varianza. Cuando la interacción fue significativa, las diferencias entre grupos se establecieron por un test de Tukey, utilizando el paquete "Multcomp".

Para los análisis de componentes principales se utilizó el paquete “Vegan”. Las variables (concentración de diferentes metabolitos) fueron estandarizadas previamente.

Capítulo 3: Resultados

Respuestas de plantas Col-0 a nuestro tratamiento de competencia

Sabemos que ST2a tiene un rol clave en la atenuación de las defensas mediadas por jasmonatos en respuesta a un cambio en el ambiente lumínico que simula la presencia de competidoras (Fernández-Milmanda et al., 2020). Sin embargo, hasta el momento desconocemos la relevancia de este mecanismo en un contexto de competencia real. Para estudiarlo, lo primero que hicimos fue definir una condición de competencia con plantas vecinas, probando que las plantas respondan a nuestro tratamiento.

La reducción en la relación lámina/pecíolo es una respuesta típica del SAS que le permite a las plantas posicionar el tejido fotosintético de manera tal de interceptar más luz. Comparamos este parámetro entre condiciones sin competencia (1 planta por maceta) y con competencia (4 plantas por maceta), para evaluar la respuesta a la presencia de competidoras. Encontramos que la relación entre la lámina y el pecíolo disminuyó con nuestro tratamiento de competencia (Fig. 3.1.A). Luego cuantificamos, bajo los mismos dos tratamientos, la expresión de genes utilizados comúnmente como marcadores de sombra, que son inducidos en respuesta a la inactivación del phyB: *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 1 (PIL1)*, *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 2 (ATHB2)*, *LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1 (HFR1)* e *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 2 (IAA2)*. La expresión de los genes marcadores de sombra aumentó en nuestras condiciones de competencia (Fig. 3.1.B). Estos resultados nos indican que las plantas responden con cambios fisiológicos y en la expresión génica a nuestro tratamiento de competencia.

Para comenzar a estudiar el mecanismo de inactivación de jasmonatos en respuesta a la presencia de competidoras, cuantificamos la expresión de *ST2a*. Observamos que la expresión de este gen aumenta en nuestras condiciones de competencia (Fig. 3.1.B). Confirmamos estos resultados realizando otros dos experimentos independientes en los que se cuantificó la expresión de *ST2a* y uno de los marcadores de sombra (Fig. 3.1.C). El aumento en la expresión de *ST2a* podría llevar a una mayor inactivación de los jasmonatos particularmente en condiciones de competencia.

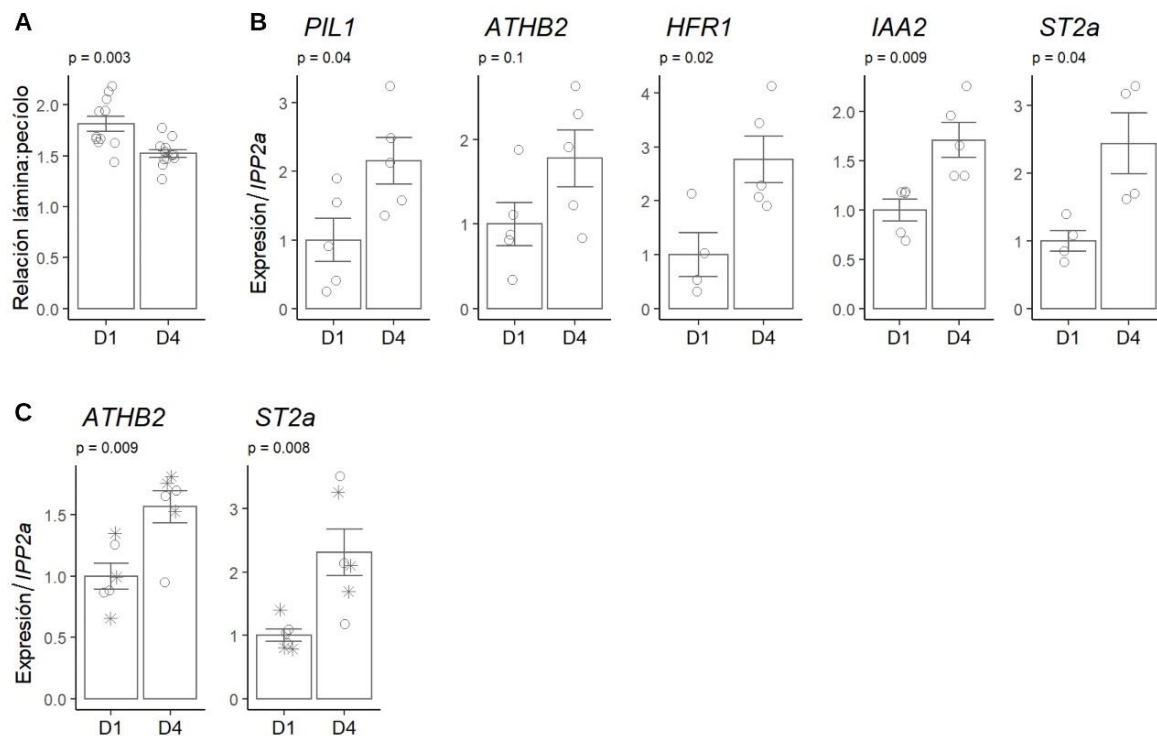


Figura 3.1. Las plantas Col-0 respondieron a la presencia de vecinas aumentando la expresión de *ST2a*. Respuestas a la presencia de vecinas, comparando plantas Col-0 que crecen sin competencia (D1 = 1 planta por maceta) y con competencia (D4 = 4 plantas por maceta). A) Relación entre el largo de la lámina y el largo del pecíolo de la hoja más joven completamente expandida, en plantas de 8 semanas ($n = 11/12$). B y C) Expresión de genes marcadores clásicos de respuesta a sombra: *PIL1*, *ATHB2*, *HFR1* e *IAA2* y de *ST2a*. Se utilizó IPP2a como gen de referencia. Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. En B) $n = 4/5$, en C) se muestran dos experimentos cada uno con $n = 3$, las réplicas de un experimento se grafican con círculos ($^{\circ}$) y las del otro con asteriscos (*). A, B y C) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes (para expresión génica cada réplica es un pool de 3 plantas). Se muestran los p-valores del test de t-Student, t-Welch o del modelo mixto, según corresponda.

Caracterización de plantas Col-0 y *st2a-1* en condiciones de competencia

Una vez definido nuestro tratamiento de competencia con plantas vecinas, estudiamos la relevancia de *ST2a* en este contexto, comparando plantas salvajes Col-0 con mutantes nulas *st2a-1*.

Perfil hormonal

Cuantificamos la concentración de distintos jasmonatos en plantas Col-0 y *st2a-1* con y sin competencia. Como los niveles de jasmonatos basales suelen ser muy bajos y estar cercanos al umbral de detección (principalmente los de JA-Ile), y el rol de *ST2a* atenuando las respuestas a jasmonatos se describió en combinación con un tratamiento con metil jasmonato (Me-JA) o daño mecánico (tratamientos que aumentan fuertemente la concentración de jasmonatos) (Fernandez-Milmanda et. al, 2020), decidimos cuantificar fitohormonas bajo dos condiciones. Por un lado, un tratamiento control (sin ningún tipo de estrés adicional) y por otro lado un tratamiento de cepillado, que consistió en pasar

diariamente un pincel sobre las rosetas, con el fin de generar un aumento en la concentración de jasmonatos. En las mismas muestras en las que se midieron jasmonatos, se cuantificó la concentración de otras fitohormonas involucradas en respuestas a estrés (ABA, SA y glucósido de SA (SA-Glc), un derivado del SA).

Se realizó un análisis de componentes principales en el que se incluyeron todos los metabolitos medidos, excepto el $\text{HSO}_4\text{-JA}$. Este metabolito se excluyó del análisis ya que, tal como era esperado, plantas *st2a-1* acumulan mucho menos $\text{HSO}_4\text{-JA}$ (ver Fig 3.3.A) y queríamos evaluar si los genotipos difieren en su perfil metabólico, más allá del producto de ST2a. El primer componente principal explica el 56% de la variabilidad, tiene un fuerte componente positivo de todos los jasmonatos y un componente negativo menor de ABA, SA y SA-Glc (diferencia muestras principalmente según la concentración global de jasmonatos). El segundo componente principal explica el 18% de la variabilidad, tiene un componente positivo fuerte de SA y su derivado SA-Glc, y un componente negativo menor de ABA (diferencia muestras principalmente según la concentración de salicilatos). Podemos observar que las plantas bajo el tratamiento de cepillado agrupan separadas de las plantas control, y se ubican en valores mayores del PC1 (Fig 3.2). Por otro lado, dentro de cada tratamiento, las plantas *st2a-1* tienden a ubicarse en valores mayores del PC1 que las Col-0 y menores del PC2 (Fig 3.2). Por lo tanto, en nuestras condiciones parece haber diferencias entre genotipos en el perfil hormonal. Además, las plantas en condiciones de competencia también tienden a ubicarse en valores mayores del PC1 que las plantas sin competencia (excepto para las Col-0 bajo el tratamiento de cepillado) (Fig 3.2).

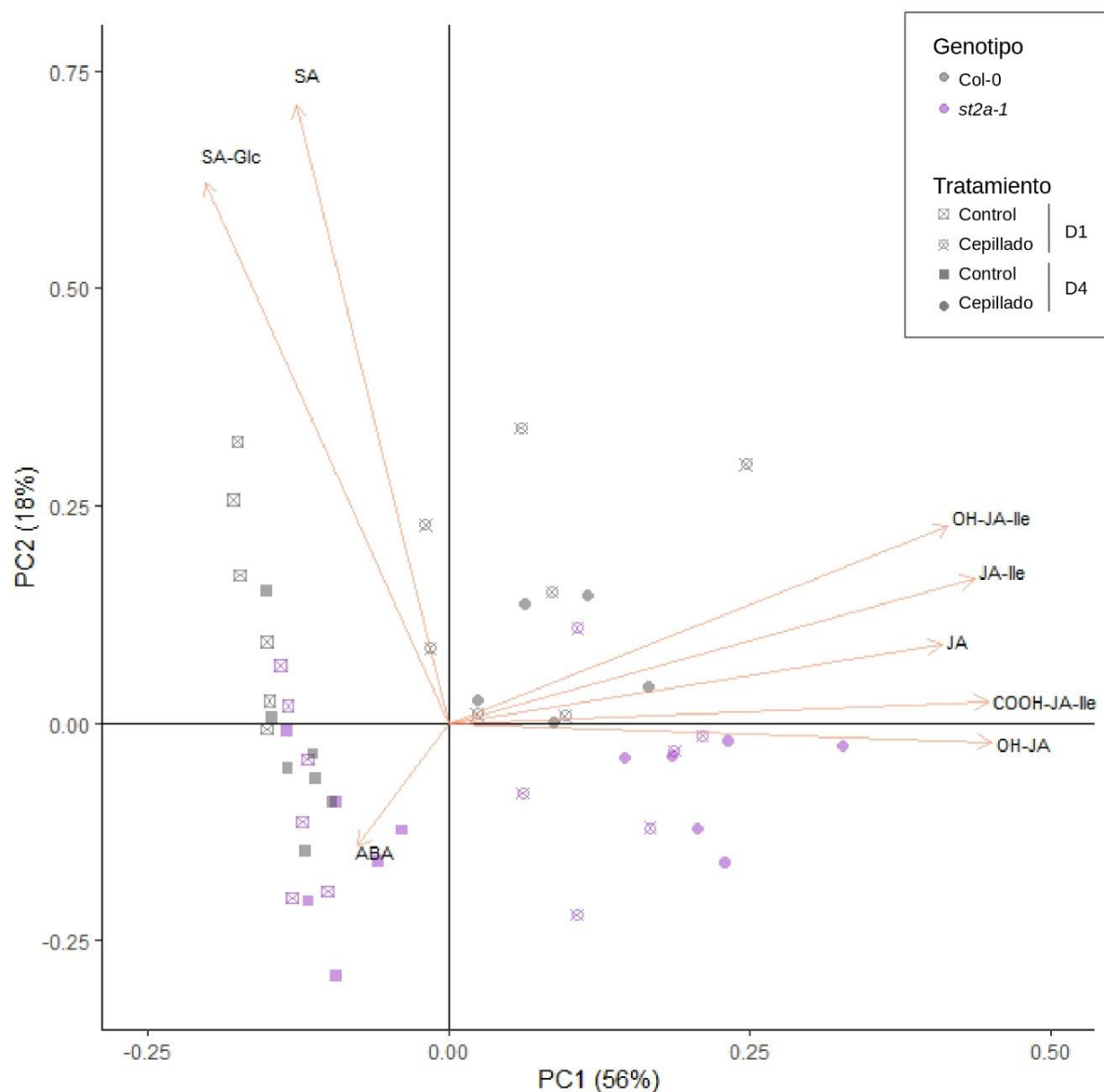


Figura 3.2 Plantas *st2a-1* difirieron de plantas Col-0 en su perfil metabólico. Análisis de componentes principales del perfil metabólico de plantas Col-0 y *st2a-1*, en dos densidades de cultivo (D1 = 1 planta por maceta y D4 = 4 plantas por maceta), bajo tratamiento control y de cepillado. Se incluyen en el análisis distintos jasmonatos (JA, JA-Ile, OH-JA, OH-JA-Ile y COOH-JA-Ile), SA, SA-Glc y ABA.

Analizando cada variable por separado observamos que en respuesta al tratamiento de cepillado los jasmonatos aumentaron, aproximadamente en un orden de magnitud (Fig. 3.3.A). Por otro lado, tanto en condiciones control como bajo el tratamiento de cepillado, plantas *st2a-1* produjeron sólo trazas de $\text{HSO}_4\text{-JA}$ y acumularon significativamente más OH-JA y COOH-JA-Ile que las Col-0, independientemente de la presencia de competidoras (Fig. 3.3.A). Como el pulso de JA-Ile muchas veces es difícil de detectar, recientemente se propuso evaluar la sumatoria de JA-Ile y sus conjugados oxidados (OH-JA-Ile y COOH-JA-Ile), como una medida del JA-Ile que se produjo y acumuló en el tiempo (Fernández-Milmanda et al., 2020). Hasta el momento no se conocen vías de síntesis de OH-JA-Ile y COOH-JA-Ile independientes del JA-Ile, por lo que se cree que los conjugados oxidados pasaron por JA-Ile en un tiempo

anterior (Heitz, 2021; Wasternack & Feussner, 2018). Plantas *st2a-1* acumularon más jasmonatos conjugados con isoleucina totales que las plantas Col-0, lo que sugiere que las *st2a-1* acumularon más jasmonatos bioactivos tanto en condiciones basales como en respuesta al tratamiento de cepillado (Fig. 3.3.B).

No observamos diferencias entre genotipos en la concentración de ABA (Fig. 3.3.C). En cambio, las plantas *st2a-1* presentaron una menor concentración de SA y glucósido de SA (SA-Glc) (Fig. 3.3.D). En *Arabidopsis*, las respuestas de defensa mediadas por SA y por jasmonatos son generalmente antagónicas (Li, Han et al., 2019; Thaler et al., 2012). Se ha reportado que cepas patogénicas de *Pseudomonas* producen un metabolito análogo del JA-Ile, que restringe la acumulación de SA al inducir la vía de señalización del JA-Ile (Gao et al., 2022; Zheng et al., 2012). Posiblemente la menor acumulación de SA en plantas *st2a-1* sea una consecuencia de su mayor acumulación de jasmonatos conjugados con isoleucina.

Pese a que en plantas Col-0 la presencia de vecinas produce un aumento en la expresión de *ST2a* (Fig. 3.1), no observamos una mayor acumulación de su producto (HSO₄-JA) ni una disminución en la concentración de los otros jasmonatos en respuesta a la competencia (Fig. 3.3.A). Por el contrario, en condiciones control los jasmonatos conjugados con Ile totales, el JA y el OH-JA aumentaron significativamente con la presencia de vecinas (Fig. 3.3.A, 3.3.B). Bajo el tratamiento de cepillado, también se observó un aumento en la concentración de JA-Ile (aunque no en los jasmonatos conjugados con isoleucina totales) y OH-JA en presencia de competidoras (Fig. 3.3.A).

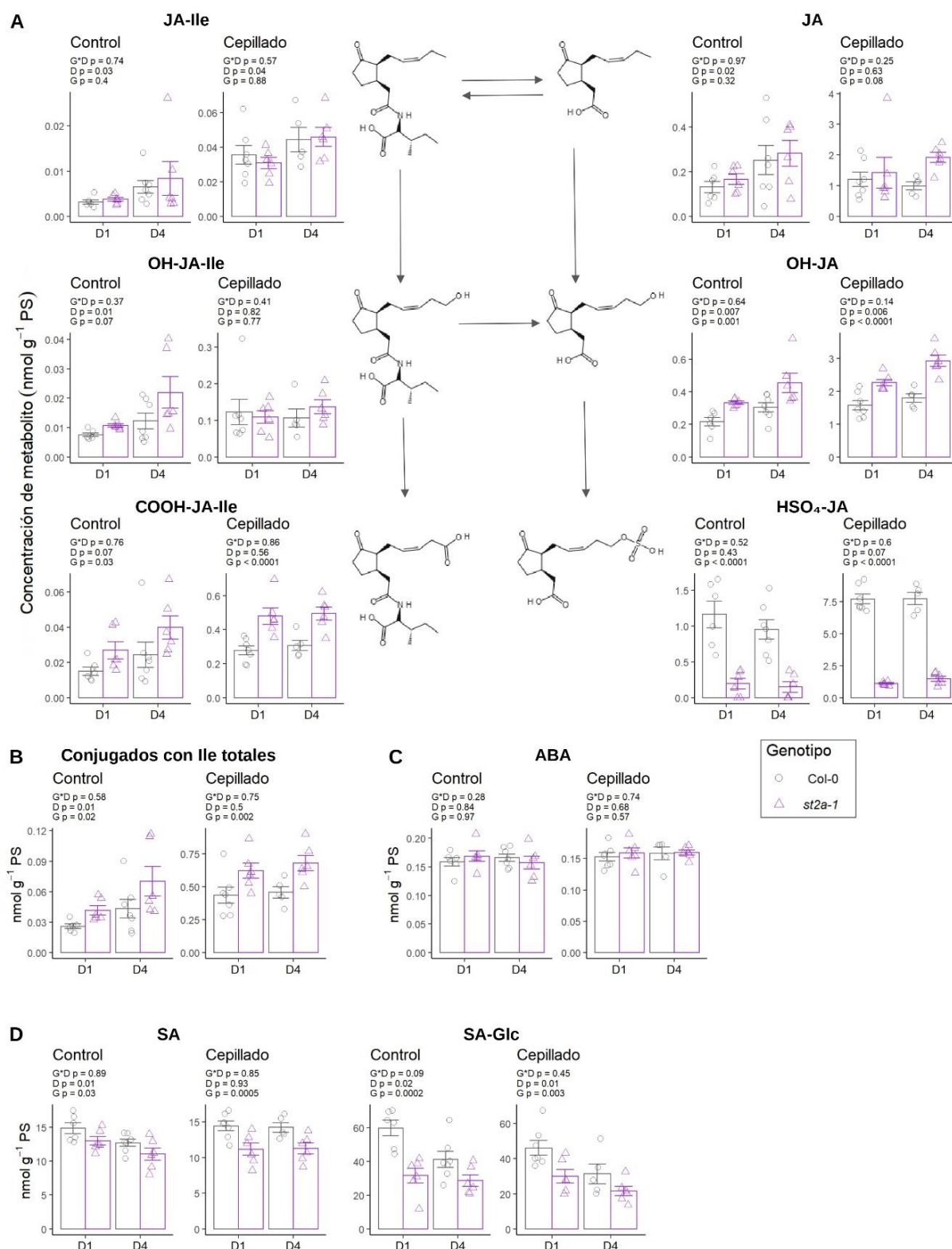


Figura 3.3. Plantas *st2a-1* acumularon más jasmonatos conjugados con Ile. La presencia de vecinas no atenuó la concentración de jasmonatos. Concentración de distintos metabolitos en plantas Col-0 y *st2a-1*, en dos densidades de cultivo (D1 = 1 planta por maceta y D4 = 4 plantas por maceta), bajo tratamiento control y de cepillado. A) Concentración de JA, JA-Ile y los productos de su catabolismo (OH-JA-Ile, COOH-JA-Ile, OH-JA y HSO₄-JA). Se muestran esquemas de las moléculas correspondientes a cada jasmonato y con flechas se representan las reacciones enzimáticas que ocurren en las plantas. B) Concentración de jasmonatos conjugados

con Ile totales = JA-Ile + OH-JA-Ile + COOH-JA-Ile. C) Concentración de ABA. D) Concentración de SA y un producto de su catabolismo, SA-Glc. A, B, C y D) Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes (cada observación es un pool de 3 plantas, n = 5-7). Se muestran los p-valores del ANOVA (G = genotipo, D = densidad, G*D = interacción de los dos factores). PS = peso seco.

Realizamos un experimento independiente con una mayor intensidad de competencia (8 plantas por maceta), y únicamente en condiciones control (sin estrés adicional por cepillado).

Obtuvimos un perfil de metabolitos consistente con el primer experimento. En el análisis de componentes principales, la componente principal 1 explica el 46% de la variabilidad y tiene un componente positivo de los jasmonatos y un componente negativo de ABA y en menor proporción de SA y SA-Glc. Las plantas *st2a-1* se agrupan en valores mayores del componente principal 1 que las Col-0, y las plantas en condiciones de competencia se agrupan en valores mayores del componente principal 1 que las plantas sin competidoras (Fig 3.4.A).

Al analizar cada variable por separado podemos ver que la presencia de plantas vecinas produjo un aumento en la concentración de los jasmonatos conjugados con Ile totales y OH-JA (Fig. 3.4.B). Por otro lado, las *st2a-1* produjeron sólo trazas de HSO₄-JA y acumularon más OH-JA y jasmonatos conjugados con Ile totales (Fig. 3.4.B). Podemos afirmar que en nuestras condiciones las plantas Col-0 inactivan jasmonatos por la vía de ST2a; y en plantas *st2a-1*, que no cuentan con esta vía, aumenta el pool de jasmonatos conjugados con Ile. A diferencia del primer experimento, no encontramos diferencias significativas entre genotipos en la concentración de SA y SA-Glc, aunque hay una tendencia (no significativa) a que las *st2a-1* acumulen menos SA y SA-Glc en condiciones de competencia.

Ambos factores (el genotipo y la competencia) tuvieron efectos independientes entre sí, en los dos experimentos realizados (excepto únicamente para el JA en el segundo experimento). Es decir, no encontramos que las diferencias entre genotipos en la concentración de jasmonatos dependan de la presencia de competidoras (Fig. 3.3.A y 3.4.B). Sin embargo, desconocemos si, en este rango, las plantas responden a los jasmonatos bioactivos de manera lineal a su concentración.

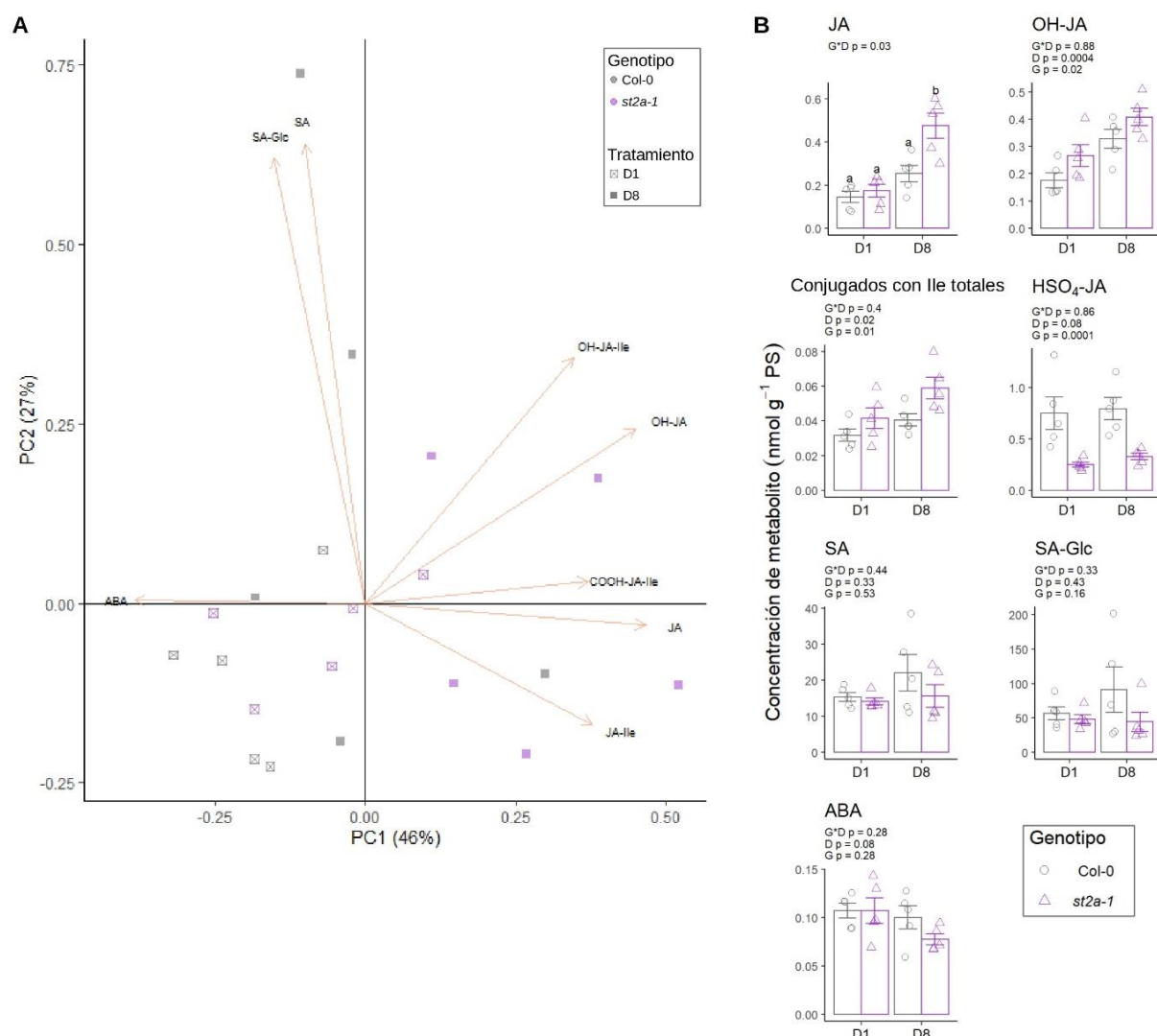


Figura 3.4. Aumentando la densidad de siembra, la presencia de vecinas no atenuó la concentración de jasmonatos. A) Análisis de componentes principales del perfil metabólico de plantas Col-0 y *st2a-1*, en dos densidades de cultivo (D1 = 1 planta por maceta y D8 = 8 plantas por maceta). B) Concentración de JA, OH-JA, conjugados con Ile totales (JA-Ile + OH-JA-Ile + COOH-JA-Ile), HSO₄-JA, SA, SA-Glc y ABA en plantas Col-0 y *st2a-1*, en dos densidades de cultivo (D1 = 1 planta por maceta y D8 = 8 plantas por maceta) (n = 5). Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas (cada réplica es un pool de 3 plantas). Se muestran los p-valores del ANOVA, cuando la interacción G*D fue significativa (p < 0.05) se realizaron contrastes de Tukey, letras distintas indican diferencias significativas (Tukey < 0.05) (G = genotipo, D = densidad, G*D = interacción de los dos factores). PS = peso seco.

Expresión de genes y metabolitos marcadores de jasmonatos

Dado que encontramos que tanto la presencia de plantas vecinas como la inactivación genética de *ST2a* causan un aumento en los jasmonatos conjugados con isoleucina, continuamos evaluando si estas diferencias son capaces de desencadenar una mayor activación de las respuestas a JA-Ile. Para ello, estudiamos la expresión de genes y la acumulación de metabolitos especializados dependientes de la vía del JA-Ile.

Medimos la expresión de *AOC4*, *JAZ1*, *MYC2*, *VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2 (VSP2)* y *PLANT DEFENSIN 1.2 (PDF1.2)*, ya que estos genes se inducen en respuesta al JA-Ile y son utilizados como marcadores de la vía (Cerrudo et al., 2017; Fernández-Milmanda et al., 2020; Moreno et al., 2009; Stenzel et al., 2003). *AOC4* codifica para una enzima que participa en la biosíntesis del JA; *JAZ1* para una de las proteínas represoras JAZ; *MYC2* codifica para el principal factor de transcripción que induce la expresión de genes de respuesta al JA-Ile; *VSP2* codifica para una fosfatasa ácida que tiene una función anti-herbívoros; y *PDF1.2* está involucrado en la resistencia contra patógenos necrótrofos (Liu et al., 2005; Wasternack & Strnad, 2018).

Consistente con la mayor acumulación de jasmonatos conjugados con Ile, las plantas *st2a-1* presentaron una mayor expresión de *AOC4*, *JAZ1*, *MYC2* y *VSP2*, independientemente de la presencia de competidoras (Fig. 3.5). La expresión de *PDF1.2* mostró una respuesta opuesta a los otros genes marcadores, plantas *st2a-1* presentaron una menor expresión de este gen que las Col-0 (Fig. 3.5).

No hubo un efecto claro de la densidad sobre la expresión de genes marcadores del JA-Ile. Mientras que la expresión de *JAZ1* aumentó con la presencia de plantas vecinas, la de *VSP2* disminuyó y la de *AOC4*, *MYC2* y *PDF1.2* se mantuvo igual (Fig. 3.5). Si bien la concentración de jasmonatos conjugados con isoleucina aumentó con la presencia de plantas vecinas, esto no parece afectar de una forma clara a la expresión de los genes marcadores medidos.

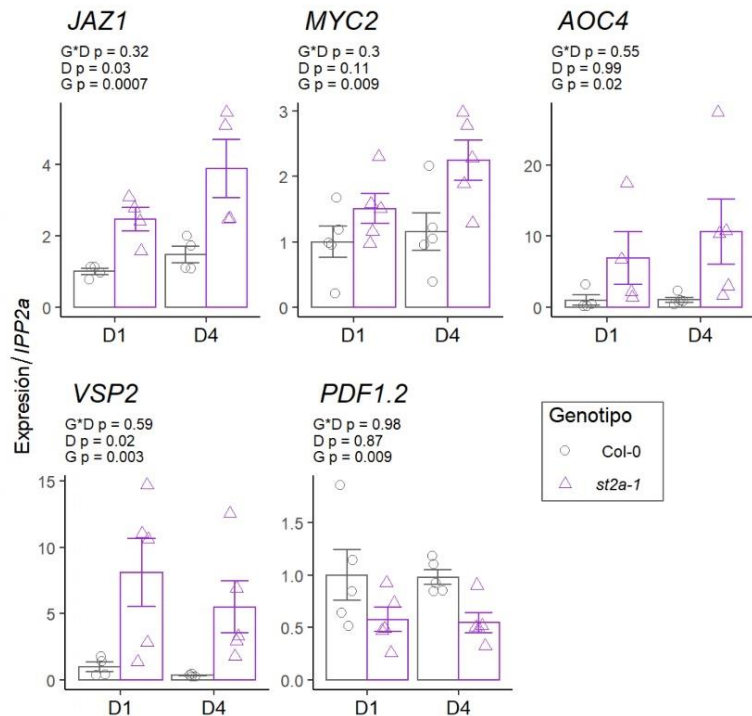


Figura 3.5. Plantas *st2a-1* presentaron una mayor expresión de genes marcadores de jasmonatos. Cuantificación de la expresión de genes marcadores de la vía del JA (*JAZ1*, *MYC2*, *AOC4*, *VSP2* y *PDF1.2*) en plantas Col-0 y *st2a-1* en dos densidades de cultivo (D1 = 1 planta por maceta y D4 = 4 plantas por maceta). Se utilizó *IPP2a* como gen de referencia. Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes

(cada réplica es un pool de 3 plantas). n = 4/5. Se muestran los p-valores del ANOVA (G = genotipo, D = densidad, G*D = interacción de los dos factores).

Cuantificamos la concentración de antocianinas y glucosinolatos (GSs), metabolitos especializados que aumentan en respuesta al JA-Ile (Mikkelsen et al., 2003; Qi et al., 2011; Schweizer et al., 2013; Shan et al., 2009). Las antocianinas son pigmentos no fotosintéticos que se acumulan en respuesta a estreses bióticos y abióticos, y funcionan como antioxidantes y fotoprotectores (Landi et al., 2015). Los GSs son los principales metabolitos de defensa contra atacantes en las Brassicáceas. Cuando se rompe el tejido (por ejemplo, por acción de un insecto herbívoro) las enzimas mirosinasas hidrolizan a los GSs dando como productos diversos metabolitos con toxicidad, como isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos y oxazolidinas (Bones & Rossiter, 2006; Chhajer et al., 2020). Los GSs se agrupan según su estructura química y es bien conocido el efecto que tiene el tratamiento con jasmonatos aumentando la concentración de GSs indólicos, aunque existen controversias en cuanto al efecto de esta vía hormonal sobre los GSs alifáticos (Bodnaryk, 1994; Cargnel et al., 2014; Guo et al., 2013; Mewis et al., 2005; Mikkelsen et al., 2003).

Consistente con la mayor concentración de jasmonatos conjugados con isoleucina totales y la mayor expresión de genes marcadores de la vía del JA-Ile, las plantas *st2a-1* acumularon más antocianinas y GSs que las Col-0, independientemente de la presencia de competidoras (Fig. 3.6.A-B). Esta mayor acumulación de GSs en las *st2a-1* se vio tanto para los GSs indólicos (I3M) como alifáticos (3MSP y 4MSOB) (Fig. 3.6.B).

Pese a la mayor concentración de jasmonatos conjugados con isoleucina observada en condiciones de competencia (Fig. 3.3.B-3.4.B), la presencia de vecinas no produjo un aumento en la concentración de antocianinas ni de GSs (Fig. 3.6.A-B). Por el contrario, la concentración de I3M disminuyó con la presencia de competidoras, en ambos genotipos por igual (Fig. 3.6.B).

El hecho de que no encontremos una mayor expresión de marcadores de la vía del JA-Ile en respuesta a la presencia de vecinas, nos podría indicar que el aumento detectado en los jasmonatos conjugados con Ile no es suficiente para generar una respuesta biológica, o bien que en respuesta a la competencia a la vez está disminuyendo la sensibilidad de las plantas a los jasmonatos bioactivos. En este sentido, está reportado que en respuesta a un ambiente lumínico que simula competencia, disminuye la sensibilidad de las plantas al JA-Ile (Cargnel et al., 2014; Chico et al., 2014; Leone et al., 2014).

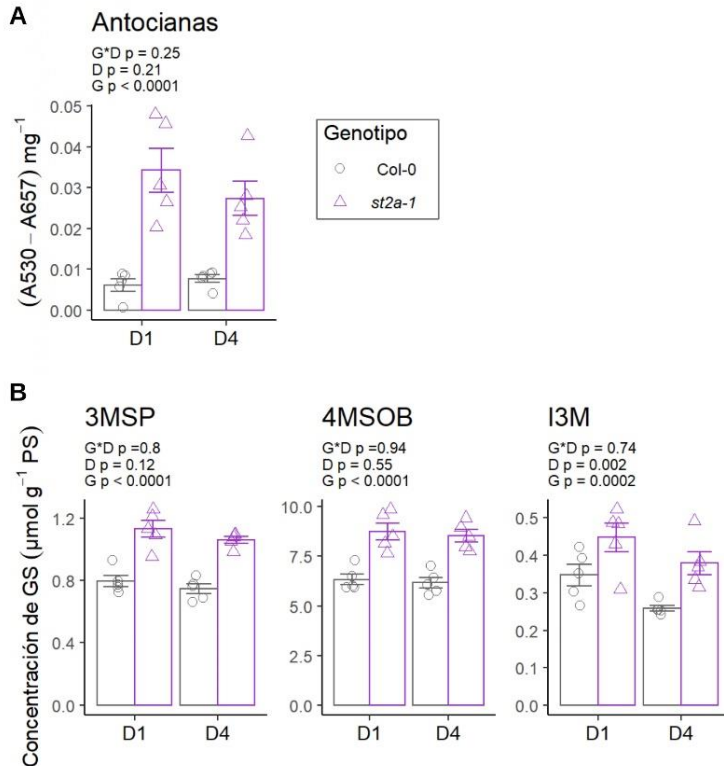


Figura 3.6. Plantas *st2a-1* acumularon más metabolitos de defensa. Cuantificación de metabolitos de defensa en plantas Col-0 y *st2a-1* en dos densidades de cultivo (D1 = 1 planta por maceta y D4 = 4 plantas por maceta). A) Contenido de antocianinas por mg de PS (expresado como la diferencia entre la absorbancia a 530 y 657 nm del extracto). B) Concentración de los representantes más abundantes de glucosinolatos alifáticos (3MSP y 4MSOB) e indólicos (I3M), por g de tejido liofilizado. Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. A y B) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes (cada réplica es un pool de 3 plantas, $n = 5$). Se muestran los p-valores del ANOVA (G = genotipo, D = densidad, $G \times D$ = interacción de los dos factores). GS = glucosinolatos, PS = peso seco.

En su conjunto los resultados de jasmonatos, genes marcadores del JA-Ile y metabolitos especializados nos indican que la inactivación de jasmonatos por la vía de ST2a parece encontrarse igual de activa tanto en presencia como en ausencia de competidoras. Es decir, en nuestras condiciones ST2a contribuyó con la inactivación de jasmonatos, independientemente de la presencia de plantas vecinas.

Crecimiento y susceptibilidad a atacantes

Nos propusimos evaluar cuáles son los efectos de no poder inactivar jasmonatos por la vía de ST2a, en cuanto al crecimiento y la capacidad de defenderse de atacantes. Como las plantas *st2a-1* presentaron una mayor inducción de la vía del JA-Ile que las Col-0 en ambas densidades de cultivo por igual y nos interesa particularmente caracterizar situaciones de competencia, decidimos continuar evaluando únicamente condiciones de crecimiento en presencia de plantas vecinas.

Los jasmonatos clásicamente se asociaron con las respuestas de defensas contra herbívoros y patógenos necrótrofos. Nos preguntamos si la mayor activación de la vía del JA-Ile en las

st2a-1 es capaz de desencadenar una mayor resistencia contra estos atacantes, y decidimos evaluar la capacidad de las plantas *st2a-1* de defenderse frente a un patógeno necrótrofo (*B. cinerea*) y frente a un insecto herbívoro (*S. frugiperda*). Nuestro grupo reportó previamente que, bajo condiciones controladas de cámara de cultivo, manipulando el ambiente lumínico para simular la presencia de competidoras (aumento del RL lateral), las plantas *st2a-1* son más resistentes frente a herbívoros y patógenos necrótrofos que las Col-0 (Fernández-Milmanda et al., 2020).

Realizamos bioensayos infectando plantas Col-0 y *st2a-1* con una suspensión de esporas de *B. cinerea*, y observamos que ambos genotipos fueron igualmente susceptibles (Fig. 3.7.A). Repetimos el experimento aumentando la densidad de esporas utilizadas en la infección, o aumentando la intensidad de la competencia entre vecinas (8 plantas por maceta), y obtuvimos resultados similares (Fig. 3.7.A). Por último, probamos modificar el protocolo de infección rociando macetas en competencia mixta (macetas con dos plantas *st2a-1* y dos plantas Col-0) con un asperjado de esporas y cuantificando el % de área lesionada para cada genotipo. Nuevamente, las plantas *st2a-1* resultaron ser igual de susceptibles a *B. cinerea* que las Col-0 (Fig. 3.7.B).

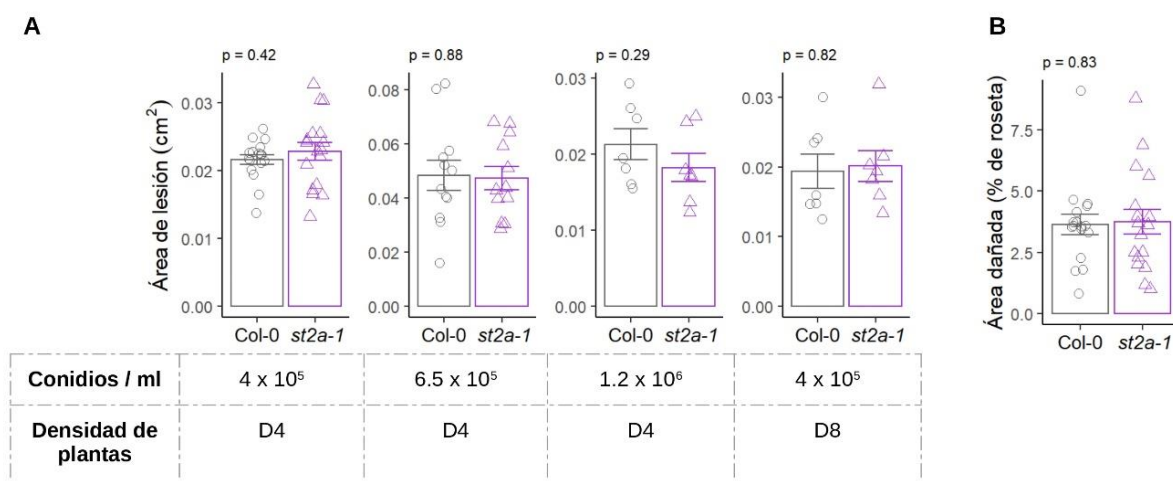


Figura 3.7. Plantas *st2a-1* fueron igual de susceptibles a *B. cinerea* que plantas Col-0. Susceptibilidad de plantas Col-0 y *st2a-1* al hongo fitopatógeno *B. cinerea*. A) Área de las lesiones causadas por una gota de 5 µl de una suspensión de esporas a distintas concentraciones. Se infectaron plantas de ambos genotipos en monocultivo a una densidad de 4 (D4) u 8 (D8) plantas por maceta (n = 17, 12, 7 y 7, en cada panel, de izquierda a derecha). Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. B) Porcentaje de la roseta que resultó dañada, a los 5 días luego de rociar macetas en cultivo mixto con una suspensión de esporas de *B. cinerea* (n = 17). A y B) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas (lesión promedio de cada maceta y genotipo). Se muestran los p-valores del test t-student (A) y del test t-student pareado (B).

Por el contrario, el % de área foliar removida por larvas de *S. frugiperda* fue mayor en las plantas Col-0 que en las *st2a-1*, bajo condiciones de competencia mixta. Resultados similares se obtuvieron en dos experimentos independientes (Fig. 3.8.A-B). Por lo tanto, podemos afirmar que las plantas *st2a-1*, en condiciones naturales de competencia mixta resultaron ser más resistentes a *S. frugiperda* que las Col-0.

Los fenotipos de resistencia a atacantes de las plantas *st2a-1* fueron consistentes con los patrones observados en los genes marcadores de defensas. Plantas *st2a-1* presentaron una mayor expresión de genes que se suelen relacionar con la rama de defensas contra herbívoros (*VSP2*, *MYC2*), pero mostraron una menor expresión en genes vinculados con respuestas a patógenos necrótrofos (*PDF1.2*) que las Col-0 (Fig. 3.5).

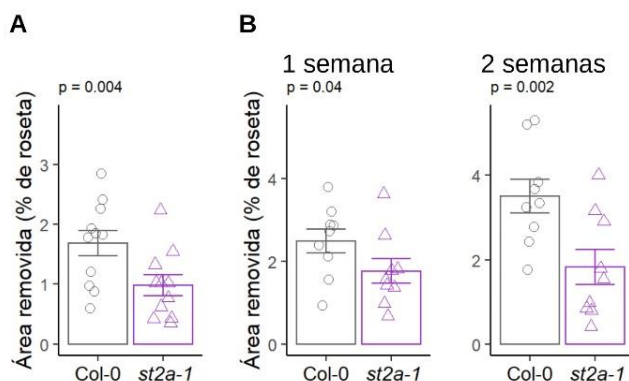


Figura 3.8. Las *st2a-1* fueron más resistentes a larvas de *S. frugiperda*. Porcentaje del área expuesta de plantas Col-0 y *st2a-1* que fue dañada por las larvas, en macetas mixtas. A) Primer experimento, las larvas se colocan en plantas de 6 semanas y el área removida se cuantifica una semana después (n = 11). B) Segundo experimento se aumenta la presión de herbivoría al colocar las larvas en plantas de 4 semanas y el área removida se cuantifica una y dos semanas después de iniciado el tratamiento (n = 9). A y B) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las observaciones (el promedio por maceta para cada genotipo). Se muestran los p-valores del test t-Student pareado.

Además de promover la inducción de respuestas químicas de defensa, los jasmonatos son potentes inhibidores del crecimiento. Nos preguntamos si la mayor activación de la vía del JA-Ile en las *st2a-1*, bajo nuestras condiciones de competencia, restringe el crecimiento. Encontramos que las *st2a-1* presentaron rosetas más chicas que las Col-0, tanto en cuanto al área foliar como en cuanto a la biomasa acumulada (Fig. 3.9.A-C).

Nuestros resultados indican que el desbalance en los jasmonatos producto de no poder inactivarlos por la vía de ST2a tiene un efecto atenuando el crecimiento y promoviendo mecanismos de defensa contra *S. frugiperda*, pero no contra *B. cinerea*.

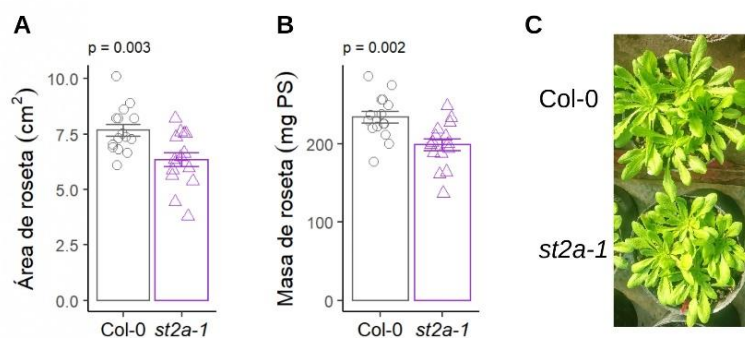


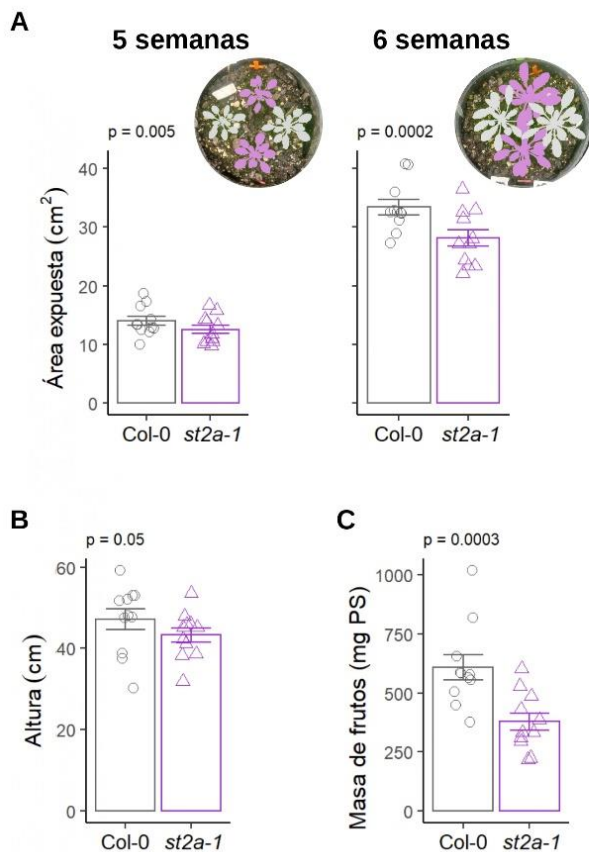
Figura 3.9. Plantas *st2a-1* presentaron rosetas más pequeñas. Desarrollo de rosetas Col-0 y *st2a-1* en competencia (4 plantas por maceta, en monocultivo). A) Área de las rosetas en plantas de 4 semanas. B) Biomasa de plantas de 6 semanas. A y B) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los

puntos las observaciones (se grafica el promedio de la maceta para cada genotipo). n = 15. Se muestran los p-valores del test t-Student. C) Fotografía de macetas al momento de cosecharlas para la medición de la biomasa. PS = peso seco.

El costo de no poder inactivar jasmonatos por la vía de ST2a sobre la producción de frutos

La menor tasa de crecimiento de las *st2a-1* podría afectar la capacidad de interceptar luz y en última instancia el éxito reproductivo en un ambiente de competencia con plantas salvajes. Decidimos realizar experimentos en competencia mixta, donde en una misma maceta compiten plantas Col-0 y *st2a-1*, y estudiar la producción de frutos en estas condiciones.

Consistente con el experimento anterior, en competencia mixta plantas *st2a-1* presentaron rosetas más chicas e interceptaron menos PAR que sus vecinas Col-0 (Fig. 3.10.A). Además, las plantas *st2a-1* tendieron a presentar escapos florales más bajos, que en un contexto de competencia mixta posiblemente impliquen una menor interceptación de PAR por parte de los tallos y hojas caulinares (Fig. 3.10.B). Para estudiar si estas diferencias en el crecimiento tienen un efecto relevante sobre el éxito reproductivo de las plantas, medimos la biomasa de frutos producida. Las *st2a-1* produjeron una biomasa de frutos mucho menor que sus vecinas salvajes (Fig. 3.10.C). En base a estos resultados, podemos afirmar que el no poder inactivar a los jasmonatos por la vía de ST2a tiene importantes costos en la producción de frutos, bajo condiciones de competencia mixta.



3.10. Plantas *st2a-1* resultaron ser malas competidoras. Desarrollo y producción de frutos en plantas Col-0 y

st2a-1 bajo competencia mixta (2 plantas Col-0 y 2 plantas *st2a-1* por maceta). A) Área expuesta al PAR directo por maceta para cada genotipo, en plantas de 5 y 6 semanas. Se muestran imágenes de una maceta representativa, en la cual las plantas *st2a-1* fueron coloreadas con violeta y las Col-0 con blanco. B) Altura de los escapos florales a las 14 semanas. C) Biomasa de frutos cosechada al final del experimento (16 semanas). A, B y C) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las observaciones (se grafica la suma (A) o el promedio (B y C) de la maceta para cada genotipo). n = 11. Se muestran los p-valores del test t-Student pareado. PS = peso seco.

Los costos de activar mecanismos de defensas, en términos de crecimiento y fitness reproductivo, pueden variar dependiendo de la presión selectiva del ambiente (por ejemplo, la presencia o no de herbívoros o de competidoras) (Züst & Agrawal, 2017). Nos propusimos estudiar el costo (en términos de producción de frutos) de no poder inactivar a los jasmonatos por la vía de ST2a en distintos contextos ambientales.

El efecto de la herbivoría

Sabiendo que, en condiciones de competencia mixta, las *st2a-1* son malas competidoras y producen muchos menos frutos que sus vecinas Col-0, pero a la vez son más resistentes a *S. frugiperda*; decidimos evaluar la producción de frutos en un ambiente con herbívoros. Esperamos que la presencia de herbívoros restrinja el crecimiento y la producción de frutos e hipotetizamos que, al ser las Col-0 más susceptibles a *S. frugiperda*, su producción de frutos se vería más afectada que la de sus vecinas *st2a-1*. Para probarlo, evaluamos la producción de frutos en macetas mixtas con larvas de *S. frugiperda*, y la comparamos con la producción en macetas mixtas control que crecieron en las mismas condiciones, pero sin el agregado de larvas.

En un primer experimento, el tratamiento de herbivoría redujo la producción por maceta en un 15% (Fig. 3.11.A-B), pero la relación entre la producción de plantas *st2a-1* y Col-0 no se vio afectada por el tratamiento de herbivoría. Las *st2a-1* produjeron una biomasa de frutos alrededor de un 30% menor que la de sus vecinas Col-0, tanto bajo presión de herbivoría como en condiciones control (Fig. 3.11.C). En un segundo experimento, se intensificó la presión de herbivoría iniciando el tratamiento en plantas más jóvenes. En este caso la herbivoría redujo la producción de frutos alrededor de un 40%, pero tampoco afectó al balance entre genotipos (las plantas *st2a-1* produjeron aproximadamente un 50% menos que las Col-0, independientemente del tratamiento) (Fig. 3.11.D-E-F). Por otro lado, observamos que las plantas *st2a-1* florecieron más tarde que las Col-0, tanto en condiciones control como bajo el tratamiento con *S. frugiperda*. En el segundo experimento, cuando las plantas tenían 6 semanas, casi todas las Col-0 estaban florecidas, mientras que menos de la mitad de las plantas *st2a-1* presentaba flores.

Pese a que en las primeras semanas luego de colocar las larvas estas mostraron una preferencia por alimentarse de plantas Col-0, las plantas salvajes aún en un ambiente con herbivoría produjeron más frutos que sus vecinas *st2a-1*. No encontramos que la presencia de herbívoros afecte al balance entre genotipos en la producción de frutos.

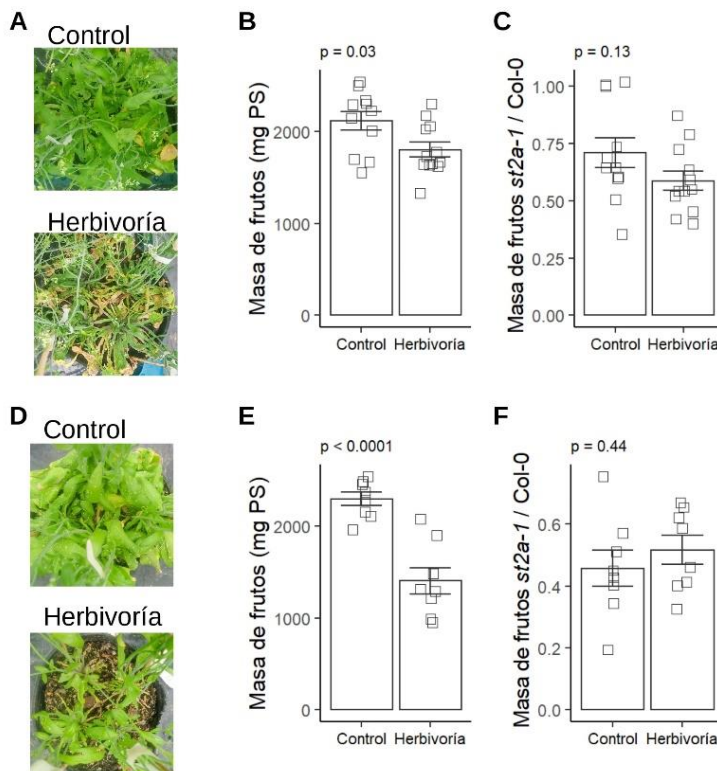


Figura 3.11. Aún en un ambiente con herbívoros, las *st2a-1* resultaron ser malas competidoras. Producción de frutos comparando macetas mixtas control y bajo presión de herbivoría. A, B y C) Primer experimento, presión de herbivoría media (n = 11) y D, E y F) segundo experimento, presión de herbivoría alta (n = 8/9). A y D) Imágenes representativas de macetas control y bajo presión de herbivoría, con plantas de 8 semanas. B y E) Biomasa total de frutos producida por maceta, comparando macetas control con aquellas que fueron tratadas con larvas de *S. frugiperda*. C y F) Relación entre la biomasa de los frutos producidos por plantas *st2a-1* y la biomasa de frutos producida por sus vecinas Col-0, para cada maceta. B, C, E y F) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes (macetas). Se muestran los p-valores del test t-Student. PS = peso seco.

El efecto del genotipo de las plantas vecinas

Otra variable ambiental que puede afectar los costos que tienen los mecanismos de defensa sobre el crecimiento y la producción de frutos es la identidad de las plantas vecinas (Van Dam & Baldwin, 1998, 2001). Vimos que plantas *st2a-1* tienen restringido su crecimiento y desempeño reproductivo cuando compiten con plantas Col-0 (Fig. 3.10). Además, la tasa de crecimiento de las plantas *st2a-1* también se ve atenuada en condiciones de competencia en monocultivo (Fig. 3.9). Nos propusimos estudiar si los costos de no poder inactivar jasmonatos por la vía de ST2a dependen de la habilidad que tengan sus vecinas para inactivar jasmonatos por esta vía. Para ello realizamos experimentos comparando plantas *st2a-1* y Col-0 en monocultivo y competencia mixta.

Consistente con los experimentos anteriores, las *st2a-1* presentaron rosetas más chicas, una mayor relación lámina/pecíolo y escapos florales más bajos que las Col-0, tanto en monocultivos como en cultivos mixtos (Fig. 3.12.A-B-C). Observamos que las *st2a-1* tienden a florecer más tarde, independientemente del tipo de competencia (a las 11 semanas,

aproximadamente la mitad de las plantas Col-0 y un cuarto de las *st2a-1* tenían flores). Nuevamente vimos que en cultivos mixtos la producción de frutos de las *st2a-1* está fuertemente comprometida, posiblemente debido a que presentan un fenotipo que no le permite interceptar tanta luz como sus vecinas salvajes. Sin embargo, resulta interesante que en competencia en monocultivo las *st2a-1* tuvieron una producción de frutos similar a las Col-0 (Fig. 3.12.D-E). El presentar fenotipos de “malas competidoras” (rosetas chicas, una alta relación lámina/pecíolo y escapos florales bajos) no tuvo costos importantes sobre la producción de frutos, cuando las vecinas con las que se compete también presentan estos fenotipos.

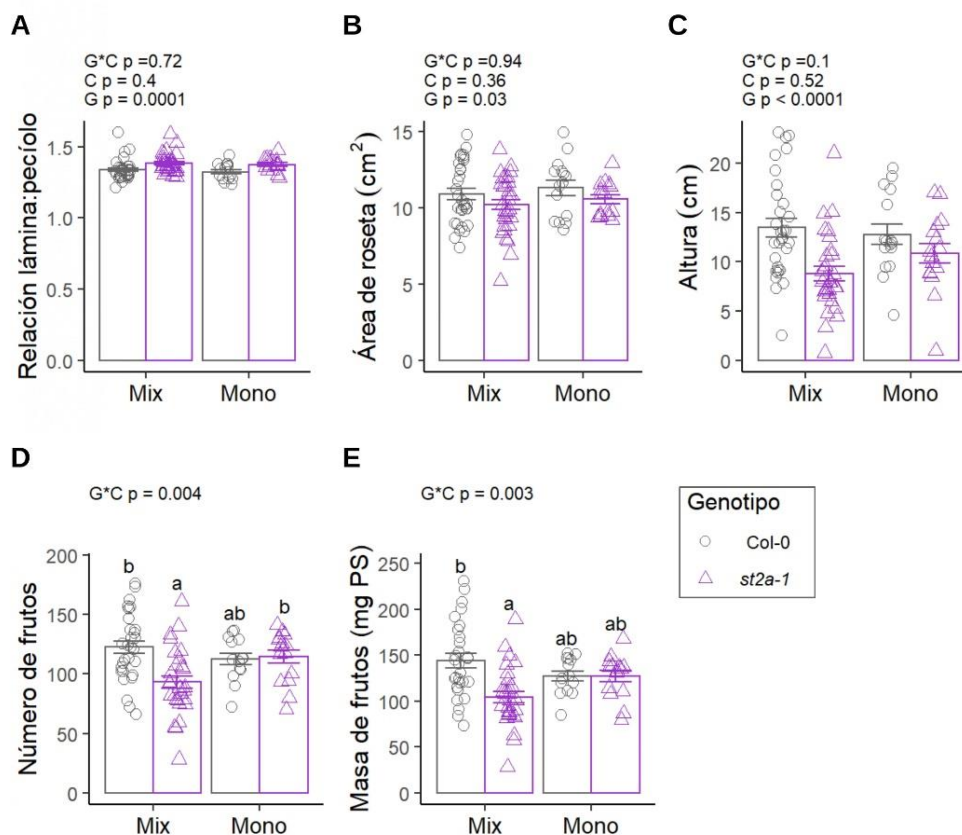


Figura 3.12. En monocultivo la producción de frutos de *st2a-1* resultó ser similar a la de Col-0. Desarrollo de plantas Col-0 y *st2a-1* en macetas mixtas y macetas en monocultivo. A) Relación del largo de la lámina / largo del pecíolo de la hoja más joven completamente expandida de cada planta, a las 5 semanas. B) Área de las rosetas a las 5 semanas. C) Altura de los escapos florales a las 12 semanas. D, E) Número (D) y biomasa (E) de frutos producidos por cada planta al final del experimento (15 semanas). A, B, C, D y E) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las observaciones (se grafica como observación al promedio de la maceta para cada genotipo) ($n_{mono} = 14/15$, $n_{mix} = 29$). Se muestran los p-valores del ANOVA, letras distintas indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$). PS = peso seco.

Validamos estos resultados repitiendo el experimento otras 3 veces y realizando un análisis conjunto de estos 3 experimentos independientes entre sí (e independientes del experimento presentado anteriormente). Las plantas *st2a-1* resultaron ser más bajas que las Col-0, independientemente del tipo de competencia (Fig. 3.13.A). Sin embargo, el efecto del genotipo sobre la producción de frutos resultó ser dependiente del tipo de competencia (Fig.

3.13.B). No hubo diferencias significativas en la biomasa de frutos producida por plantas Col-0 y *st2a-1* en monocultivo, pero en cultivos mixtos las Col-0 producen más frutos que sus vecinas *st2a-1* (Fig. 3.13.B).

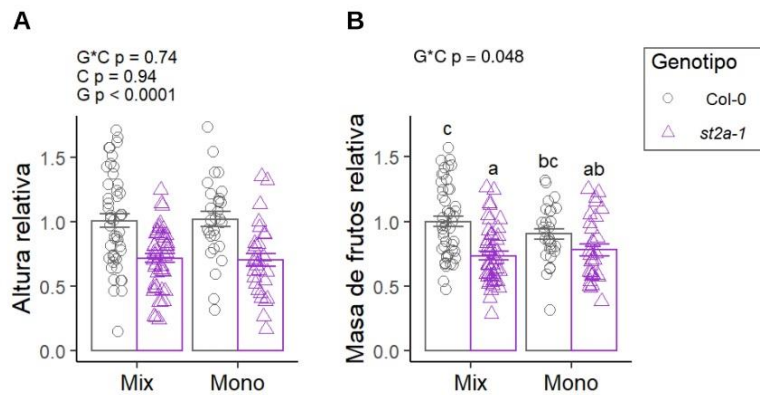


Figura 3.13. Las *st2a-1* son malas competidoras, pero en monocultivo su producción de frutos resultó ser similar a la de Col-0. Validación de los resultados obtenidos en el experimento de la figura 3.12, analizando en conjunto otros 3 experimentos independientes, en los cuales se cuantificó el crecimiento y la producción de frutos en plantas Col-0 y *st2a-1* en macetas mixtas y macetas en monocultivo. A) Altura de las plantas, relativizada a la altura promedio de las plantas Col-0 en cultivo mixto de cada experimento. B) Biomasa de frutos producidos por cada planta al final del experimento, relativizada a la biomasa promedio de las plantas Col-0 en cultivo mixto en cada experimento. A y B) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las observaciones (se grafica como observación al promedio de la maceta para cada genotipo). Se muestran los p-valores del ANOVA, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Capítulo 4: Discusión y Conclusiones

La presencia de plantas vecinas parece producir un aumento en la concentración de jasmonatos

Tal como era esperado, la presencia de competidoras produjo un aumento en la expresión de genes marcadores de sombra regulados por la vía de phyB-PIF y una respuesta típica de escape al sombreado, la reducción en la relación lámina/pecíolo (Fig. 3.1). Podemos afirmar que nuestro tratamiento de competencia es percibido por las plantas y genera cambios en la expresión génica que les permiten ajustar su morfología foliar para interceptar más luz. Esperábamos que, como parte de estos ajustes, ante la presencia de competidoras disminuya la concentración de jasmonatos bioactivos (ya que aumenta la expresión de *ST2a* (Fig. 3.1.B-C)). Sin embargo, no encontramos ningún jasmonato cuya concentración disminuya en respuesta a la presencia de plantas vecinas, al contrario, la concentración de algunos jasmonatos aumentó en presencia de competidoras (Fig. 3.3.A, Fig. 3.4.B).

Señales distintas a los cambios en el ambiente lumínico podrían explicar el aumento observado en los jasmonatos. Una de estas señales son los exudados radiculares. Se vio que el JA forma parte de estos exudados y puede generar respuestas en plantas vecinas (Kong et al., 2018; Li et al., 2023; Li, Zhao et al., 2019). Además, se describió que la loliolida, metabolito presente en exudados radiculares, produce un aumento en la concentración de jasmonatos en trigo (Li et al., 2023) y que la presencia de raíces de plantas vecinas produce un aumento en la concentración de JA en raíces de tabaco (Chen et al., 2019). Otra señal de competencia que también podría causar un aumento en los jasmonatos es el contacto mecánico con hojas de plantas vecinas. Esto podría inducir la acumulación de jasmonatos, de una forma similar al tratamiento de cepillado (Chehab et al., 2012; Darwish et al., 2022; De Wit et al., 2012; Matsumura et al., 2022; Pantazopoulou et al., 2023; Van Moerkercke et al., 2019). Por otro lado, está reportado que deficiencias de nutrientes pueden producir un aumento en la concentración de jasmonatos (Khan et al., 2016; Shikha et al., 2023; Troufflard et al., 2010). Utilizamos fertilizantes de liberación lenta, que liberan macro y micronutrientes a lo largo de todo el experimento, pero podrían haber sido insuficientes. Una menor disponibilidad de nutrientes (causada por el consumo de las plantas vecinas) también podría explicar el aumento en los jasmonatos observado en condiciones de competencia.

Para empezar a elucidar cuál/es son los mecanismos que producen un aumento en los jasmonatos en respuesta a nuestro tratamiento de competencia, en un futuro sería interesante probar si el efecto de la competencia sobre los jasmonatos depende de que haya comunicación bajo-tierra entre plantas vecinas. De hecho, realizamos experimentos en los que impedimos el contacto entre raíces, pero por problemas técnicos no pudimos obtener mediciones confiables de la concentración de jasmonatos.

El aumento observado en la concentración de jasmonatos en respuesta a la competencia, no correlaciona con un aumento en la expresión de genes marcadores del JA-Ile, ni en los metabolitos de defensa medidos (Fig. 3.5, Fig. 3.6). Por lo tanto, en nuestras condiciones, o bien el aumento en los jasmonatos conjugados con isoleucina totales es muy sutil como para

desencadenar una respuesta biológica o bien las plantas son menos sensibles al JA-Ile en presencia de competidoras. En este sentido, está reportado que la inactivación de phyB por bajas relaciones R/RL produce la degradación de las proteínas DELLA (Leone et al., 2014), lo que libera a las JAZ (Hou et al., 2010), que reprimen la expresión de genes de respuesta al JA-Ile. Por otro lado, está reportada una mayor desestabilización de los MYCs en respuesta a tratamientos de sombra (Chico et al., 2014). En nuestras condiciones de competencia una mayor disponibilidad de proteínas JAZ, y/o una menor estabilidad de los MYCs, podrían estar atenuando las respuestas al JA-Ile. Podemos pensar que, la presencia de competidoras, a la vez que lleva a un aumento en la concentración de los jasmonatos, podría estar disminuyendo la sensibilidad de las plantas a los mismos.

En un futuro sería interesante probar si en nuestras condiciones de competencia las plantas son menos sensibles al JA-Ile. Para ello sería necesario evaluar la sensibilidad a un tratamiento con jasmonatos en condiciones sin y con competencia. Por ejemplo, cuantificando la restricción sobre el crecimiento y los niveles de inducción de genes y metabolitos de defensa en respuesta a tratamientos con Me-JA.

Plantas *st2a-1* hiperacumulan jasmonatos bioactivos

Esperábamos que el aumento en la expresión de ST2a en respuesta a la presencia de vecinas (Fig. 3.1.B-C) lleve a restringir la acumulación de jasmonatos bioactivos, e incrementa la diferencia entre genotipos particularmente en contextos de competencia. Sin embargo, a nivel molecular (jasmonatos, expresión génica, anotocianas y GSs), las diferencias entre genotipos se mantienen constantes entre condiciones sin y con competencia (Fig. 3.3.A, Fig. 3.4.B, Fig. 3.5, Fig. 3.6). El aumento en la expresión de ST2a en respuesta a nuestro tratamiento de competencia fue leve en comparación al reportado previamente en respuesta a la suplementación con RL lateral (en nuestro caso el *fold-change* fue de 2.5 y en respuesta al RL se reportó de entre 5 y 80 dependiendo del experimento (Fernández-Milmanda et al., 2020)). Estas diferencias posiblemente se deban a que en nuestras condiciones de competencia la reducción en la relación R/RL haya sido menor que al suplementar con RL. Además, las plantas crecieron a la vez que sus vecinas, por lo que los cambios en el ambiente lumínico ocurrieron de manera gradual a lo largo del tiempo (a diferencia del cambio brusco durante un período corto de tiempo que se utiliza al suplementar con luz RL). Por otro lado, no podemos descartar que existan mecanismos de regulación post-transcripcional de ST2a que en respuesta a nuestras condiciones de competencia afecten la traducción, estabilidad y/o actividad de la enzima.

Podemos afirmar que en nuestras condiciones ST2a tiene un rol relevante inactivando jasmonatos, tanto cuando las plantas se encuentran compitiendo con vecinas como en un contexto sin competidoras. El no poder inactivar a los jasmonatos por la vía de ST2a afecta el balance entre los distintos jasmonatos, y plantas *st2a-1* acumularon más OH-JA (sustrato de ST2a) y jasmonatos conjugados con Ile, a la vez que produjeron mucho menos HSO₄-JA que

las plantas Col-0 (Fig. 3.3.A, Fig. 3.4.B). Esto correlaciona con una inducción de la expresión de genes marcadores del JA-Ile (excepto *PDF1.2*) y una mayor acumulación de metabolitos de defensa (antocianinas y GS) en las *st2a-1* (Fig. 3.5, Fig. 3.6.A-B). Por otro lado, las plantas *st2a-1* tendieron a acumular menos SA y SA-Glc que las Col-0 (Fig. 3.3.D, Fig. 3.4.B). Se han reportado tanto interacciones sinérgicas como antagónicas entre los jasmonatos y SA, dependiendo de la especie y la respuesta estudiada (Ullah et al., 2023). La coronatina (análogo del JA-Ile y factor de virulencia en cepas de *Pseudomonas syringae*) restringe la biosíntesis y acumulación de SA, por medio de la degradación mediada por COI1 de proteínas JAZ, y la consecuente liberación de MYCs (Gimenez-Ibanez et al., 2017; Zheng et al., 2012). Podemos pensar que la mayor acumulación de jasmonatos conjugados con Ile en las *st2a-1* posiblemente restringe la acumulación de SA por esta vía. En un futuro sería interesante estudiar la susceptibilidad de las plantas *st2a-1* a patógenos biótrophos, ya que las defensas contra este tipo de atacantes suelen estar reguladas por SA.

Plantas *st2a-1* son más resistentes a larvas de *S. frugiperda*, pero son igual de susceptibles a *B. cinerea* que las Col-0

Resulta interesante que en nuestras condiciones las plantas *st2a-1* resultaron ser más resistentes a un herbívoro (Fig. 3.8), pero no a un patógeno necrótrofo (Fig. 3.7), pese a acumular más jasmonatos conjugados con Ile (Fig. 3.3.B, Fig. 3.4.B). Además, si bien en condiciones de cámara de cultivo que simulan competencia plantas *st2a-1* presentan una mayor resistencia a ambos tipos de atacantes, en condiciones control (luz blanca) se reportó que las *st2a-1* presentan un fenotipo similar al observado en nuestras condiciones de competencia (son más resistentes a *Spodoptera*, pero igual de susceptibles a *B. cinerea* que las Col-0) (Fernández-Milmanda et al., 2020).

El JA-Ile tiene un rol promoviendo las defensas contra insectos herbívoros y patógenos necrótrofos, pero frente a cada atacante se activan distintos mecanismos de respuesta, dados por la interacción del JA-Ile con otras fitohormonas (Pieterse et al., 2012). Las defensas contra patógenos necrótrofos son reguladas de forma sinérgica por JA y ET. En el contexto de una infección con un patógeno necrótrofo, la degradación de proteínas JAZ lleva a la estabilización de ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3) y EIN3-LIKE1 (EIL1), factores de transcripción inducidos por la vía del ET que a su vez contribuyen a la inducción de genes de defensa contra patógenos necrótrofos (Song et al., 2014). Por el contrario, las defensas contra herbívoros son reguladas de forma antagónica por JA y ET, ya que, en este contexto, EIN3 y EIL1 interaccionan con MYC2 y reprimen mutuamente su actividad (Song et al., 2014). Las plantas *st2a-1* presentaron una menor expresión de *PDF1.2* que las plantas Col-0, contrastando con los otros genes marcadores del JA-Ile cuantificados (que presentaron una mayor expresión en las *st2a-1*) (Fig. 3.5). A diferencia de los otros genes marcadores, *PDF1.2* está involucrado específicamente en las respuestas de defensas contra patógenos necrótrofos, y su expresión es regulada de forma sinérgica por JA y ET (Pré et al., 2008; Zarei et al., 2011). Tanto la expresión génica como los fenotipos de susceptibilidad a atacantes parecen indicar que en las plantas *st2a-1* no se

activan todos los mecanismos de defensa regulados por jasmonatos, sino que se induce específicamente la rama de defensas contra herbívoros.

Está reportado que señales de distintos atacantes (la infección con un patógeno o un daño mecánico que simula parte del efecto de herbivoría) producen un patrón diferente en los jasmonatos. En particular, parece preponderar la acumulación de productos de oxidación del JA-Ile (OH-JA-Ile y COOH-JA-Ile) en respuesta a un daño mecánico y la acumulación de JA y OH-JA en respuesta a la infección con un patógeno (Marquis et al., 2020; Smirnova et al., 2017; Widemann et al., 2016). Sin embargo, hay que tomar estas comparaciones con cautela porque la respuesta sobre el balance de los jasmonatos se evaluó a tiempos de inducción muy distintos para cada tratamiento (3 h luego del daño mecánico y 3 días de infección).

Por otro lado, plantas mutantes en distintas enzimas del catabolismo del JA-Ile presentan diferentes patrones de acumulación de jasmonatos, y fenotipos de defensa contrastantes. En muchos casos una mayor acumulación de jasmonatos bioactivos no correlaciona con una mayor inducción de todas las respuestas de defensa mediadas por jasmonatos. Plantas incapaces de oxidar JA-Ile (triple mutante *cyp94b3 cyp94b1 cyp94c1*) son más resistentes a la infección con *B. cinerea*, pero más susceptibles a herbívoros (Marquis et al., 2020; Poudel et al., 2016). Plantas incapaces de deconjugar JA-Ile (doble mutante *iar3 ill6*) son más resistentes a larvas de *Spodoptera*, pero no a *B. cinerea* (Marquis et al., 2020). Mutantes de mayor orden incapaces tanto de deconjugar como de oxidar al JA-Ile (quíntuple mutante *cyp94b3 cyp94b1 cyp94c1 iar3 ill6*), son igual de susceptibles que las plantas salvajes a ambos atacantes, pese a acumular mucho más JA-Ile en respuesta al daño (Marquis et al., 2020). Mutantes en los genes *JOX*, que tienen atenuada la oxidación de JA a OH-JA, presentan una mayor resistencia tanto a patógenos necrótrofos como a herbívoros (Caarls et al., 2017; Marquis et al., 2022; Smirnova et al., 2017).

Los distintos fenotipos de resistencia observados al alterar el catabolismo del JA-Ile podrían explicarse por diferencias en la regulación negativa de la vía del JA-Ile. Se reportó una correlación negativa entre la capacidad de la planta de defenderse y la inducción de la expresión de genes JAZ (y otros represores) en respuesta al atacante (Marquis et al., 2020). Además, podría jugar un rol la regulación de la traducción, ya que se vió que la asociación de un grupo específico de mRNAs a los ribosomas se encuentra atenuada en dobles mutantes *cyp94b3 cyp94b1*, lo que explicaría, al menos en parte, la falta de correlación entre la acumulación de JA-Ile y la inducción de respuestas a esta fitohormona (Kimberlin et al., 2021).

Si bien el JA-Ile es el jasmonato biológicamente más activo, en los últimos años se ha reportado actividad de otros jasmonatos, algunos de ellos por la vía canónica de correceptores COI1-JAZ (OH-JA-Ile y formas conjugadas con otros aminoácidos). Se ha visto que estos ligandos alternativos al JA-Ile tienen distinta afinidad por complejos correceptores específicos y se propone que podrían regular las respuestas finas a los jasmonatos (Fu et al., 2022; Jimenez-Aleman et al., 2019; Poudel et al., 2019; Yan et al., 2016). Existe redundancia entre proteínas JAZs, pero también se reportaron funciones específicas, y recientemente se

han descrito grupos de proteínas JAZs que reprimen respuestas contra patógenos pero no contra herbívoros o viceversa (Guo et al., 2018; Johnson et al., 2023; Liu et al., 2021). Por lo tanto, cambios en el patrón de jasmonatos podrían afectar diferencialmente a la estabilidad de distintas proteínas JAZ, que a su vez van a reprimir respuestas específicas.

Por otro lado, la especificidad podría estar regulada por la interacción con otras vías hormonales. Distintas alteraciones en el catabolismo del JA-Ile podrían afectar diferencialmente a otras fitohormonas y un ejemplo claro es IAR3 que también es capaz de deconjugar auxinas y activar así esta vía hormonal (Zhang et al., 2016). Además, en nuestras condiciones las plantas *st2a-1* tendieron a acumular menos SA que las Col-0 (Fig. 3.3.D, Fig. 3.4.B). Si bien esta fitohormona clásicamente se considera antagónica de las defensas mediadas por jasmonatos, existen trabajos que sugieren que la vía del SA tendría un rol, menor e independiente de la vía del JA/ET, promoviendo la resistencia a patógenos necrótrofos como *B. cinerea* (AbuQamar et al., 2006; Ferrari et al., 2003; Zhang et al., 2017). Por lo tanto, la menor acumulación de SA en las plantas *st2a-1* podría contribuir en parte a las diferencias observadas en la susceptibilidad a los distintos atacantes.

Podemos concluir que, en nuestras condiciones, el desbalance en los jasmonatos producto de no poder inactivarlos por la vía de ST2a produce un fenotipo típico de una planta que hiperacumula jasmonatos bioactivos, en cuanto a la susceptibilidad a larvas de *S. frugiperda*. Sin embargo, no produce ningún efecto sobre la resistencia a *B. cinerea*. Nuestros resultados fueron consistentes con trabajos previos que concluyen que alteraciones en el catabolismo de los jasmonatos producen respuestas en las plantas que no correlacionan con los niveles de acumulación de jasmonatos bioactivos, sino que parecerían depender del balance con otros jasmonatos, otras fitohormonas y/o de la fina regulación de *loops* negativos (Kimberlin et al., 2021; Marquis et al., 2020, 2022; Zhang et al., 2024).

Aún queda mucho por elucidar sobre el mecanismo por el cual alteraciones en la vía de inactivación de jasmonatos por medio de ST2a afectan diferencialmente a las respuestas de defensa. Sería interesante en un futuro comparar la dinámica en los jasmonatos y la activación de *loops* negativos de regulación en respuesta a distintos atacantes (herbívoros y patógenos necrótrofos), en plantas salvajes y *st2a-1*.

Las plantas *st2a-1* son malas competidoras, tanto en presencia como en ausencia de herbívoros

Nuestros resultados indican que el no poder inactivar jasmonatos por la vía de ST2a tiene importantes costos en contextos de competencia con plantas salvajes. Las mutantes *st2a-1* desarrollaron rosetas de menor tamaño (Fig. 3.9) y al competir con plantas salvajes, su producción de frutos se vio fuertemente comprometida (Fig. 3.10.C). Esto posiblemente se deba a que las plantas *st2a-1* interceptaron menos luz que sus vecinas Col-0 tanto en el estadio de rosetas (posiblemente debido a que presentaron rosetas de menor tamaño y una mayor relación L/P), como en el estadio reproductivo (ya que presentaron escapes florales de

menor altura) (Fig. 3.10.A-B). Al interceptar menos luz van a contar con menos fotoasimilados disponibles para el llenado de frutos. Estos resultados son consistentes con los trabajos que proponen que una mayor activación de la vía de los jasmonatos conlleva costos sobre el crecimiento y el éxito reproductivo (Cipollini et al., 2017; Guo et al., 2018, 2022).

Existen antecedentes en distintas especies en los que se observó que plantas con una mayor capacidad de defenderse resultan ser malas competidoras en un ambiente sin atacantes, pero presentan ventajas en presencia de consumidores (Baldwin, 1998; Ballhorn et al., 2014; Creissen et al., 2016; Wuest et al., 2022; Yang et al., 2023). En un ambiente con atacantes, la ventaja que otorga una mayor inducción de mecanismos de defensa puede compensar sus costos (en cuanto a la producción de frutos). Dado que las plantas *st2a-1* fueron más resistentes a larvas de *S. frugiperda* que las plantas Col-0, esperábamos que al competir en un ambiente bajo presión de herbivoría la producción de las plantas Col-0 se viera más afectada que la de sus vecinas *st2a-1*. Sin embargo, en nuestros experimentos la menor producción de frutos de las *st2a-1*, en comparación a sus vecinas Col-0, se mantuvo incluso en un ambiente con herbívoros. Pese a que las larvas de *S. frugiperda* realizaron un mayor daño sobre las plantas Col-0 en comparación a las *st2a-1* (Fig. 3.8.A-B), esto no afectó al balance entre genotipos en cuanto a la biomasa de frutos producida (Fig. 3.11.C, Fig. 3.11.F).

La evaluación del daño causado por las larvas se realizó en las primeras semanas de tratamiento, mientras que la cosecha de frutos fue unas 3 semanas después, durante las cuales las larvas continuaron creciendo y alimentándose. Desconocemos si esta mayor resistencia de las *st2a-1* al ataque de las larvas se mantuvo hasta el final del experimento. Podría ocurrir que las larvas fueron selectivas en un principio, pero luego dejaron de serlo, o cambiaron su preferencia (ya sea por características propias del estadio larval, por quedarse con poco tejido de rosetas salvajes o porque las plantas Col-0 indujeron mecanismos de defensas y con el tiempo pasaron a estar igual de bien defendidas que sus vecinas *st2a-1*). De hecho, está reportado que los GSs afectan de forma negativa al crecimiento de larvas de *Mamestra brassicae* y *S. litoralis*, excepto en los últimos estadios larvales, donde se observa un efecto opuesto (Jeschke et al., 2017). Podría ocurrir entonces que en los últimos estadios las larvas presenten una preferencia de alimentación distinta a la observada en los primeros estadios.

Por otro lado, las plantas Col-0 podrían ser más tolerantes a la herbivoría. La tolerancia reduce el impacto de la herbivoría sobre el éxito reproductivo, está relacionada con la capacidad de rebrote y es un mecanismo distinto a la resistencia (que reduce el daño ocasionado por herbívoros sobre las plantas) (Agrawal & Fishbein, 2008; Mitchell et al., 2016). En solanáceas, está reportado que plantas que acumulan menos JA son más tolerantes a la herbivoría (Machado et al., 2013, 2017). Si bien no evaluamos el crecimiento luego del daño por herbivoría, en distintos experimentos sin herbivoría observamos que las plantas Col-0 presentaron una mayor tasa de crecimiento que las *st2a-1*, lo que podría afectar positivamente al rebrote. Además, las Col-0 florecieron antes que sus vecinas y las larvas de *S. frugiperda* prefirieron comer hojas de rosetas antes que hojas caulinares, escapes y flores

(para estos últimos dos no se registró daño, y en hojas caulinares se observó daño, pero mucho menos que en las hojas de la roseta). Este patrón de daño es el esperado para un insecto generalista como *S. frugiperda*, ya que las hojas jóvenes y los órganos reproductivos son los que acumulan más metabolitos de defensa (De Vries et al., 2017; Hopkins et al., 2009; Hunziker et al., 2021). Podría ser que las plantas Col-0 compensen su mayor susceptibilidad a *S. frugiperda* al florecer antes y crecer más rápido (características que le darían mayor tolerancia a la herbivoría por larvas de *S. frugiperda*), dando como resultado que el balance entre genotipos en la producción de frutos no se vea afectado por la herbivoría.

En un futuro, sería interesante repetir los experimentos de herbivoría agregando macetas en monocultivo y evaluando el daño a lo largo del tiempo (para poder determinar si al modificarse el estadio larval o la edad de las plantas cambia la preferencia de alimentación). Además, con experimentos en monocultivo se puede monitorear tanto el daño sobre las plantas como el crecimiento del herbívoro (evaluando el peso de las larvas). Quizás, dependiendo de la edad de las plantas al ser atacadas por herbívoros y del estadio larval de los mismos, el efecto sobre la producción de frutos resulte o no ser más fuerte en plantas Col-0.

En monocultivos la producción de frutos de plantas *st2a-1* fue similar a la de plantas salvajes

Resulta interesante que el costo de no poder inactivar a los jasmonatos por la vía de ST2a, en términos de biomasa de frutos producida, depende de la capacidad para inactivar a los jasmonatos que tengan sus vecinas. En condiciones de competencia mixta (donde compiten plantas *st2a-1* con plantas Col-0) estos costos resultaron ser mayores que en condiciones de competencia en monocultivo (donde compiten plantas del mismo genotipo) (Fig. 3.13.D-E, Fig. 3.14.B). En los cultivos mixtos las plantas Col-0 tendieron a incrementar su producción de frutos, en comparación a los monocultivos, a la vez que en las *st2a-1* tendió a disminuir. El aumento en las Col-0 es similar a la disminución en las *st2a-1* (en promedio de alrededor del 10%). Esta respuesta simétrica a la competencia indica que los genotipos difieren en su habilidad competitiva (Cossani & Sadras, 2021). En competencia mixta, el fenotipo de “mala competidora” de las *st2a-1* (rosetas más chicas, mayor L/P, menor altura de escapos florales) genera una oportunidad para sus vecinas Col-0, que terminan tomando una mayor proporción de los recursos disponibles y restringiendo la producción de frutos de las *st2a-1*. Sin embargo, en monocultivos, la producción final de las *st2a-1* es muy similar a la producción de las Col-0 (Fig. 3.12.D-E, Fig. 3.13.B).

Nuestros resultados son consistentes con lo reportado previamente en *Nicotiana attenuata* y *Arabidopsis*, al comparar la producción de frutos en plantas que difieren en la capacidad de defenderse. En cultivos mixtos el costo de una mayor inducción de las defensas sobre la producción de frutos es mayor que en monocultivos (Dietrich et al., 2005; Glawe et al., 2003; Van Dam & Baldwin, 1998, 2001). También está reportado que mutantes de *Arabidopsis* en genes vinculados a las defensas que presentan una mayor tasa de crecimiento temprana,

tuvieron ventajas en su *fitness* cuando compitieron con plantas salvajes, pero no cuando las plantas crecieron aisladas (Züst et al., 2011). Estos trabajos, al igual que nuestros resultados, sugieren que los costos de las defensas sobre la producción de frutos se vuelven evidentes particularmente cuando compiten plantas de distintos genotipos, donde las plantas que mejor se defienden tienen una desventaja en la adquisición de recursos.

Es claro que el *fitness* a nivel individual en plantas incapaces de inactivar a los jasmonatos por la vía de ST2a está fuertemente comprometido. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que, a una escala poblacional, esto no implicaría desventajas importantes. Plantas *st2a-1* que hiper-acumulan jasmonatos y son malas competidoras a nivel individual, al ser sembradas en monocultivos producen una cantidad de frutos similar a las plantas salvajes (Fig. 3.12.D-E, Fig. 3.13.B). Estos resultados están en línea con trabajos en distintas especies que muestran que plantas con alta habilidad competitiva no presentan ventajas en monocultivos, e incluso la producción por m² se maximiza con plantas malas competidoras a nivel individual, que pueden ser cultivadas a una mayor densidad de siembra (Cossani & Sadras, 2021; Lake et al., 2016; Pantazopoulou et al., 2021; Wuest et al., 2022; Zhai et al., 2021). Por lo tanto, obtener plantas más compactas (malas competidoras) es a menudo deseable desde el punto de vista agronómico. El manipular la vía de inactivación de los jasmonatos podría ser una estrategia promisoría para el logro de este objetivo.

En un futuro, sería interesante evaluar el desempeño de plantas Col-0 y *st2a-1* en monocultivos a una mayor densidad de siembra. Tal vez las *st2a-1*, al ser menos competitivas, terminen produciendo una mayor biomasa de frutos en este contexto.

Nuestros resultados sugieren que al manipular el catabolismo de los jasmonatos se podrían obtener plantas más compactas que se defiendan mejor contra herbívoros, sin que esto necesariamente conlleve costos importantes sobre el rendimiento en condiciones de competencia en monocultivo. Para confirmarlo sería necesario evaluar el desempeño de las plantas *st2a-1* en monocultivos bajo presión de herbivoría.

Conclusiones generales

El no poder inactivar a los jasmonatos por la vía de ST2a (en mutantes *st2a-1*) lleva a un aumento en el pool de jasmonatos bioactivos y en la expresión de genes y metabolitos marcadores de JAs. En condiciones de competencia, esto correlaciona con un menor crecimiento y una mayor resistencia a un herbívoro (*S. frugiperda*), pero no a un patógeno (*B. cinerea*).

Plantas mutantes *st2a-1* tienen importantes costos, en cuanto a la producción de frutos, en un contexto de competencia con plantas salvajes. Estos costos se mantienen en un ambiente con herbívoros, pero desaparecen (o se atenúan fuertemente) cuando la competencia ocurre entre plantas del mismo genotipo.

Concluimos que, en nuestras condiciones de competencia, la inactivación de jasmonatos por medio de ST2a restringe las defensas contra herbívoros, pero no contra patógenos, y es relevante para promover el crecimiento y la habilidad competitiva. ST2a resultó ser relevante para el éxito reproductivo en cultivos mixtos. Sin embargo, en monocultivos, la inactivación de jasmonatos por medio de ST2a no parece tener un efecto relevante sobre la producción de frutos. El manipular esta vía de inactivación de los jasmonatos podría llegar a ser una estrategia promisorio para la obtención de cultivos más compactos, si es que este mecanismo se encuentra conservado en especies de interés agronómico.

Anexo

Introducción: jasmonatos y respuestas a alta intensidad de luz

Las plantas necesitan de la luz como fuente de energía, pero el exceso de energía lumínica puede llevar a una superabundancia de especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden terminar dañando los fotosistemas y disminuyendo el rendimiento de los cloroplastos y su capacidad de fijar carbono. Las plantas cuentan con diversos mecanismos para atenuar los efectos negativos del exceso de energía lumínica que básicamente consisten en 1) reducir el PAR incidente en los fotosistemas (por ejemplo con el movimiento de hojas y cloroplastos o por la absorción de compuestos no fotosintéticos); 2) reducir la clorofila excitada (por mecanismos que promueven la disipación térmica); 3) detoxificar los ROS producidos (por sistemas y enzimas antioxidantes) y 4) reparar el daño sobre los fotosistemas (por ejemplo con la biosíntesis “de novo” de la subunidad D1 del fotosistema II) (Li et al., 2009; Liu, Lu et al., 2019; Shi et al., 2022).

Las plantas responden a altas intensidades de luz con cambios a nivel genético, fisiológico y morfológico que les permiten incrementar estos mecanismos de foto-protección (Huang et al., 2019; Liu, Lu et al., 2019; Shi et al., 2022). Una de estas respuestas es el aumento en la concentración de antocianinas. Las antocianinas son pigmentos no fotosintéticos y se cree que tienen un rol en la foto-protección, al funcionar como “pantallas” que absorben parte del PAR que de lo contrario incidiría sobre los fotosistemas, y como antioxidantes (Araguirang & Richter, 2022; Landi et al., 2015; Shi et al., 2023). Otra de estas respuestas a la alta intensidad de luz es el aumento en el grosor y densidad de las hojas, que optimiza el funcionamiento de los fotosistemas en este ambiente (Poorter et al., 2009).

Por un lado, está reportado que los jasmonatos promueven la biosíntesis de antocianinas y el engrosamiento de las hojas (Havko et al., 2016; Qi et al., 2011; Shan et al., 2009). Por otro lado, en los últimos años emergió un rol de los jasmonatos en las respuestas a distintos estreses abióticos, como frío, sequía, salinidad y metales pesados (Rahman et al., 2024; Raza et al., 2021; Wang et al., 2020). También existen trabajos que vinculan a la vía de los jasmonatos con las respuestas a estrés por alta intensidad de luz (o en combinación de alta intensidad de luz y cambios en la temperatura), pero su rol no está tan claro como frente a otros estreses abióticos (Balfagón et al., 2019; Demmig-Adams et al., 2013; Fernández-Milmanda, 2023; Gollan & Aro, 2020; Huang et al., 2019; Myers et al., 2022; Savchenko et al., 2017; Youssef et al., 2010).

El objetivo de este trabajo es aportar a la comprensión del rol que juegan los jasmonatos y su catabolismo en las respuestas a un estrés por alta intensidad de luz (AL).

Hipotetizamos que 1) en respuesta a AL aumenta la concentración de jasmonatos, y esto contribuye a la foto-protección en este ambiente estresante, y 2) alteraciones en el catabolismo de los jasmonatos (en particular en la vía de ST2a) van a afectar a estas respuestas.

Materiales y métodos

Plantas y condiciones de crecimiento

Todos los experimentos se realizaron con plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Se utilizaron plantas salvajes ecotipo Columbia (Col-0), mutantes *st2a-1*, sobreexpresantes *35S:ST2a* (Fernández-Milmanda et al., 2020) y mutantes *aos* (Park et al., 2002). Todos los genotipos se encuentran en fondo genético Columbia.

Las semillas se sembraron en placas de petri plásticas con tierra de jardín (sustrato profesional exterior, Hi-Soil), y se dejaron 72 hs en oscuridad a 4°C para inducir la germinación. A los 4 días, las plántulas se trasplantaron en macetas individuales (capacidad 35 cm³, 3cm de diámetro) con una mezcla de tierra (sustrato profesional exterior, Hi-Soil): Perlita 10:1 y se fertilizaron con N16-P7-K15 (Floranid Tween Permanent, Floranid®) (1gr fertilizante/litro de sustrato).

Las plantas fueron cultivadas en cámara de cultivo con un fotoperíodo de día corto (10hs luz, 14hs oscuridad) a 23°C y luces LED blancas (PAR 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para el tratamiento de alta intensidad lumínica (AL), las plantas fueron colocadas bajo iluminación LED blanca de alta intensidad (PAR 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Se controló la temperatura colocando una pecera con agua entre la fuente de alta intensidad de luz y las plantas; y agregando ventiladores en la proximidad (Fig 4.1). Se mantuvo el mismo fotoperíodo en ambos tratamientos, los experimentos que duraron un día o más, tuvieron sus respectivas noches en oscuridad (el tratamiento de un día de AL consistió en 12h AL + 10 h de oscuridad + 2h AL). En todos los experimentos se utilizaron plantas de aproximadamente 4 semanas. Las plantas se distribuyeron al azar en distintos grupos: un grupo control, que continúa con la luz de crecimiento; y uno o dos grupos expuestos a distintos tiempos de AL. El tratamiento de AL se inició a distintos tiempos, de forma tal de realizar la cosecha o medición de todas las plantas al mismo momento.



Figura 4.1. Fotografía del sistema de AL. Se puede ver la fuente de luz LED, la pecera con agua colocada debajo, el estante grillado con las plantas y ventiladores por debajo.

En el último experimento las plantas fueron cultivadas en invernadero bajo media-sombra. A las 4 semanas las plantas se trasladaron al campo experimental del IFEVA. Un grupo se mantuvo bajo media sombra y otro grupo fue expuesto a la luz solar plena.

Cuantificación de metabolitos y expresión génica

La cuantificación de fitohormonas, antocianas, expresión génica y área de las rosetas se realizó tal como fue descripta anteriormente (en Capítulo 2: Materiales y Métodos). Con la única modificación que la cuantificación de antocianas se realizó a partir de un disco de hoja de 0.5 cm de diámetro, y se relativizó al peso fresco del disco. La secuencia de los primers utilizados para la cuantificación de la expresión génica se detalla en la Tabla 2.

Gen	Primer_Fw	Primer_Rv
<i>VSP1</i>	GGGCGTACTGGTCGTGGTTA	CCGGGAGTCCTGGAGTTGAT
<i>ELIP1</i>	TATCCCGGTGGGAGTGAGATG	GCTAAACTTTGTGCTACACCTT
<i>IPP2A</i>	ATGGTTCAGATTGGTGGTGGAC	AAAGATGTTTCAGAGTTTGTGGATGG

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados como primers en las PCRs en tiempo real.

Cuantificación de área y masa foliar

Para calcular la masa foliar por unidad de área expuesta (LMA) se tomaron fotografías de las plantas y se cuantificó el área de roseta con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems). Luego las rosetas se cosecharon y se secaron en estufa a 60°C por 72 h. Se tomó el peso seco en balanza de precisión y se estimó la masa foliar por unidad de área como la relación entre área/biomasa de roseta.

El área dañada se cuantificó a partir de fotografías, con Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems). Dado que los genotipos presentan diferencias en el área de las rosetas, el área dañada se expresa en % del área foliar.

Cuantificación de fluorescencia de la clorofila

Para estimar la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II, se utilizó un fluorímetro portátil de pulso modulado (FluorPen FP 100, Photon Systems Instruments). Una hoja joven completamente expandida de cada planta fue aclimatada en oscuridad por 15 minutos, con los “clips” que posee el fluorímetro para tal fin. Las hojas fueron irradiadas con un pulso de luz modulada de baja intensidad para obtener el valor de fluorescencia inicial (F₀). Luego, se aplica un pulso de luz saturante y se mide la fluorescencia máxima emitida por las hojas (F_m). A partir de estas mediciones la eficiencia máxima del fotosistema II puede ser calculada como $(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$, donde F_v = fluorescencia variable = fluorescencia máxima – fluorescencia inicial. La intensidad del pulso de luz modulada y del pulso de luz saturante fueron puestas a punto para nuestras plantas siguiendo las especificaciones del equipo.

Análisis estadístico

Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron en R versión 4.0.5 (2021). Cuando se compararon dos grupos se realizaron tests t-Student o tests t-Welch (cuando la varianza entre los dos grupos no fue homogénea). En los experimentos en los que se compara 3 tratamientos se realizó un ANOVA de un factor. En los experimentos donde se comparan dos o más genotipos en dos o más tratamientos, se realizaron ANOVAs de dos factores. Cuando fue necesario, la función 'weights = varPower', del paquete "NLME" se utilizó para modelar la varianza. Las diferencias entre grupos se establecieron por un test de Tukey, utilizando el paquete "Multcomp".

Resultados

Comenzamos validando nuestro sistema de alta intensidad lumínica, y para ello caracterizamos respuestas típicas de las plantas a altas intensidades de luz en nuestro tratamiento. Cuantificamos respuestas a nivel genético (expresión del gen marcador de alta intensidad de luz *ELIP1*), bioquímico (concentración de antocianinas) y morfológico (área de roseta y masa foliar por área expuesta (LMA)).

Tal como era esperado, en respuesta a nuestro tratamiento de alta intensidad de luz en plantas salvajes Col-0 aumentó la expresión de *ELIP1*, la concentración de antocianinas y la LMA, a la vez que tiende a disminuir el área de las rosetas (Fig. 4.2.A-E).

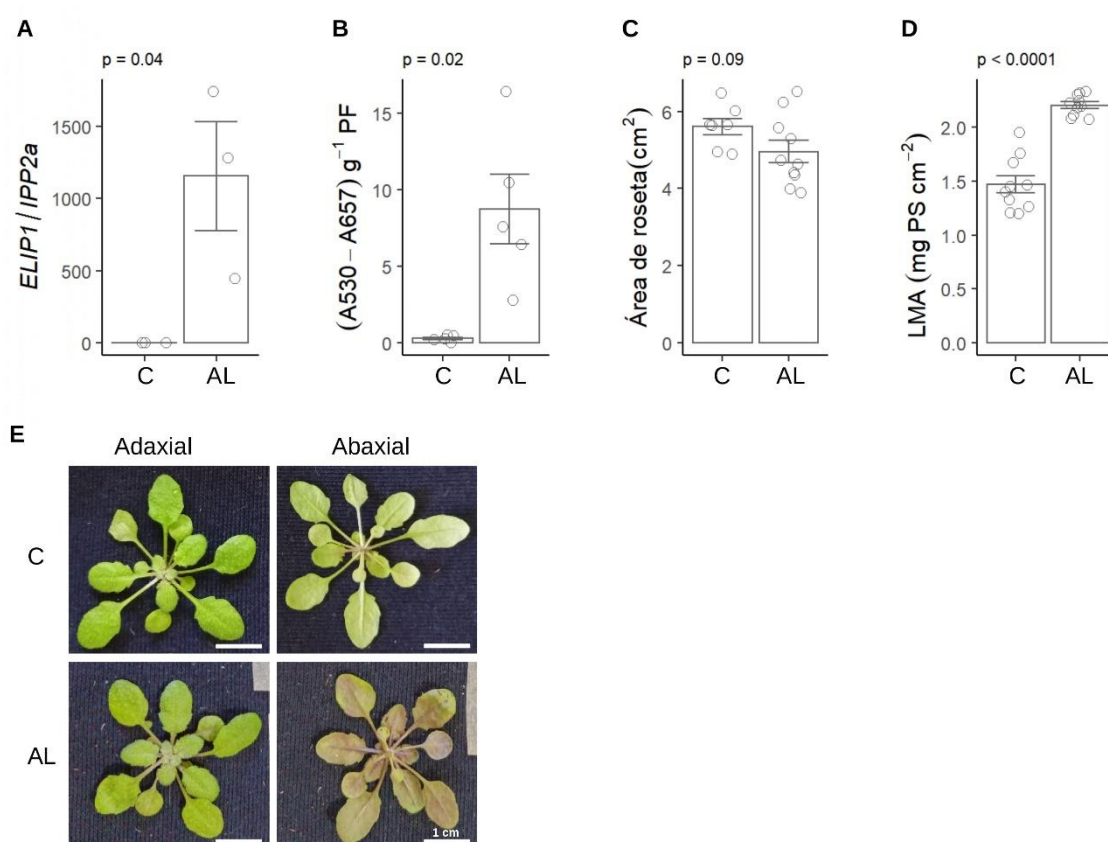


Figura 4.2. Plantas Col-0 responden a nuestro tratamiento de alta intensidad de luz. Caracterización de la

respuesta a alta intensidad de luz en plantas Col-0. A) Expresión del gen marcador *ELIP1* en plantas control y expuestas a 6hs de AL (n = 3). Se utilizó IPP2a como gen de referencia. B) Contenido de antocianinas en plantas control y bajo tratamiento de AL, a las 24h de iniciado el tratamiento (n = 5). C-D) Área de las rosetas (C) y masa foliar por unidad de área (D) en plantas control y bajo tratamiento de AL, a los 3 días de iniciado el tratamiento (n = 9/10). E) Fotografías de plantas representativas en condiciones control y en AL, a los 3 días de iniciado el tratamiento, donde se muestra la cara adaxial y abaxial. Nótese la diferencia en la morfología de la roseta y la coloración entre tratamientos. Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes (para expresión génica cada réplica es un pool de 3 plantas). Se muestran los p-valores del test de t-Student o t-Welch. C = condiciones control, AL = alta intensidad de luz, PF = peso fresco, PS = peso seco.

Continuamos estudiando la concentración de distintos jasmonatos en plantas Col-0, en condiciones control y de AL. No encontramos que el tratamiento de AL afecte a la concentración de OH-JA y HSO₄-JA; pero vimos que los jasmonatos conjugados con Ile totales aumentaron en respuesta a AL, y la concentración de JA tendió a aumentar (aunque para JA las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas) (Fig. 4.3.A). Continuamos analizando la expresión de un gen marcador de la vía del JA-Ile (*VSP1*) y vimos que su expresión se indujo con el tratamiento de alta intensidad de luz (Fig. 4.3.B). Estos resultados sugieren que en respuesta al tratamiento de AL aumentan los jasmonatos bioactivos y este aumento es suficiente para inducir cambios en la expresión génica.

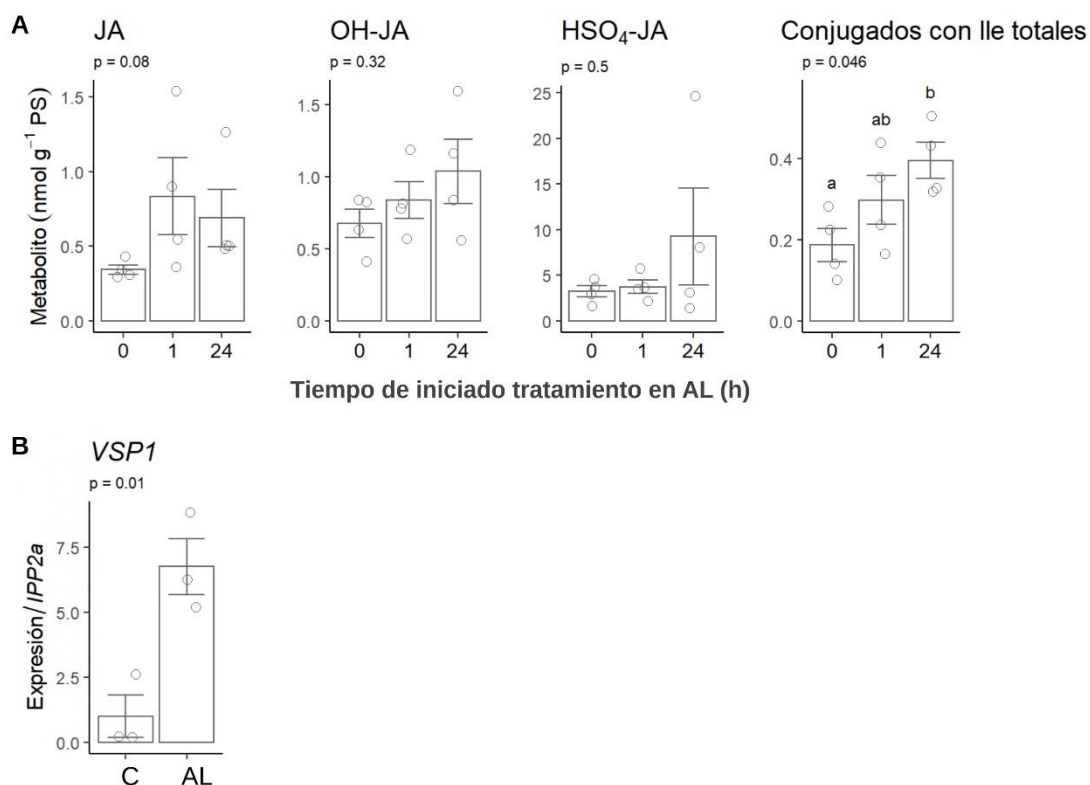


Figura 4.3. En respuesta a la alta intensidad de luz aumentan los JAs. Caracterización de la respuesta a alta intensidad de luz en plantas Col-0. A) Concentración de JA, OH-JA, HSO₄-JA y jasmonatos conjugados con isoleucina (JA-Ile + OH-JA-Ile + COOH-JA-Ile), en plantas control y bajo tratamiento de AL, a la hora y a las 24 horas de iniciado el tratamiento (n = 4). Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. B) Expresión del gen marcador de la vía del JA-Ile *VSP1*, en plantas control y expuestas 6 h a AL (n = 3). Se utilizó IPP2a como gen de referencia. A y B) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes (cada réplica es un pool de 3 plantas). Se muestran los p-valores del

ANOVA de un factor (A) o del test t-Student (B), con letras distintas se indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$). C = condiciones control, AL = alta intensidad de luz, PS = peso seco.

Dado que en respuesta a altas intensidades de luz aumentaron los jasmonatos bioactivos, y sabemos que los jasmonatos regulan positivamente la acumulación de antocianas y la LMA y negativamente el tamaño de las rosetas (Havko et al., 2016; Huang et al., 2017; Qi et al., 2011; Shan et al., 2009), nos preguntamos si los cambios observados en las antocianas, la LMA y el área de las rosetas en respuesta a altas intensidades de luz son regulados por los jasmonatos. Buscando aproximar una respuesta a esta pregunta, comparamos el efecto que tiene nuestro tratamiento de AL, en plantas salvajes y mutantes *aos*, que son mutantes nulas en una enzima de biosíntesis de jasmonatos, y por lo tanto son incapaces de sintetizar esta fitohormona.

Encontramos que en plantas *aos* está atenuado el aumento en la concentración de antocianas en respuesta al tratamiento de AL (Fig. 4.4.A). Por lo tanto, los jasmonatos son necesarios para que las plantas puedan acumular antocianas en respuesta a este cambio en el ambiente lumínico. El efecto del tratamiento sobre la LMA y el área de las rosetas fue igual para ambos genotipos, por lo tanto, los jasmonatos no parecieran estar involucrados en el aumento del LMA ni en la reducción del tamaño de las rosetas en respuesta a altas intensidades de luz (Fig 4.4.B-C). Notar que, tal como está reportado, al no sintetizar jasmonatos, las plantas *aos* presentaron rosetas más grandes que las Col-0 (independientemente del tratamiento) (Fig 4.4.B). No vimos diferencias en el LMA entre genotipos (Fig 4.4.C).

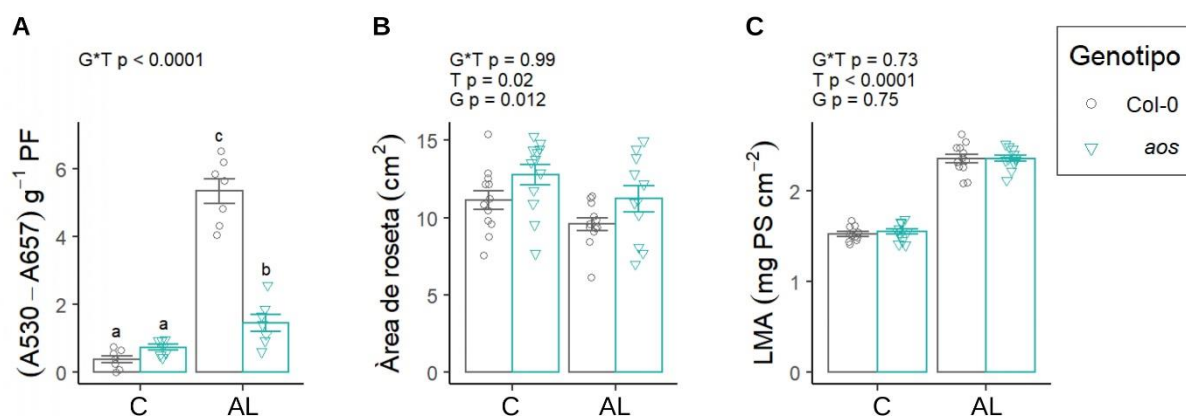


Figura 4.4. El aumento en la concentración de antocianas en respuesta a AL está atenuado en plantas *aos*. Caracterización de la respuesta a alta intensidad de luz en plantas Col-0 y *aos*. A) Contenido de antocianas en plantas control y bajo tratamiento de AL, a las 24 h de iniciado el tratamiento ($n = 7$). B-C) Área de las rosetas (B) y masa foliar por unidad de área (C) en plantas control y bajo tratamiento de AL, a los 3 días de iniciado el tratamiento ($n = 12$). A, B y C) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes. Se muestran los p-valores del ANOVA, letras distintas indican diferencias significativas (Tukey $p < 0.05$). C = condiciones control, AL = alta intensidad de luz, PF = peso fresco, PS = peso seco.

En base a estos resultados podemos plantear un modelo en el que, en respuesta a altas intensidades de luz, aumentan los jasmonatos bioactivos, lo que lleva a un aumento en la expresión de genes de respuesta a jasmonatos y en la acumulación de antocianas.

Dado que los jasmonatos parecen tener un rol en las respuestas a altas intensidades de luz, nos propusimos estudiar los efectos de alteraciones en el catabolismo de los jasmonatos

sobre estas respuestas. Comparamos la acumulación de jasmonatos en respuesta a altas intensidades de luz en plantas Col-0, mutantes y sobreexpresantes de *ST2a* (*st2a-1* y *35S:ST2a* respectivamente).

Tal como era esperado, plantas *st2a-1* acumularon menos $\text{HSO}_4\text{-JA}$ que las Col-0. Plantas *35S:ST2a* presentaron la misma concentración de $\text{HSO}_4\text{-JA}$ que plantas salvajes (pese a sobreexpresar *ST2a*), pero acumularon menos de los otros jasmonatos (Fig. 4.5.A-D). Esto podría explicarse por la regulación positiva que ejerce la vía del JA-Ile sobre la misma biosíntesis de jasmonatos. Posiblemente las plantas *35S:ST2a* inactivan más rápido al JA-Ile, lo que llevaría a una menor acumulación de jasmonatos bioactivos y una menor biosíntesis de jasmonatos. Resulta interesante que el efecto del tratamiento sobre la concentración de jasmonatos conjugados con Ile totales dependió del genotipo (Fig. 4.5.D). Plantas *35S:ST2a* parecen responder menos al tratamiento de altas intensidades de luz que las *st2a-1* (mientras que las Col-0 presentaron una respuesta intermedia). Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de *ST2a* estaría atenuando la acumulación de jasmonatos bioactivos particularmente en respuesta a altas intensidades lumínicas.

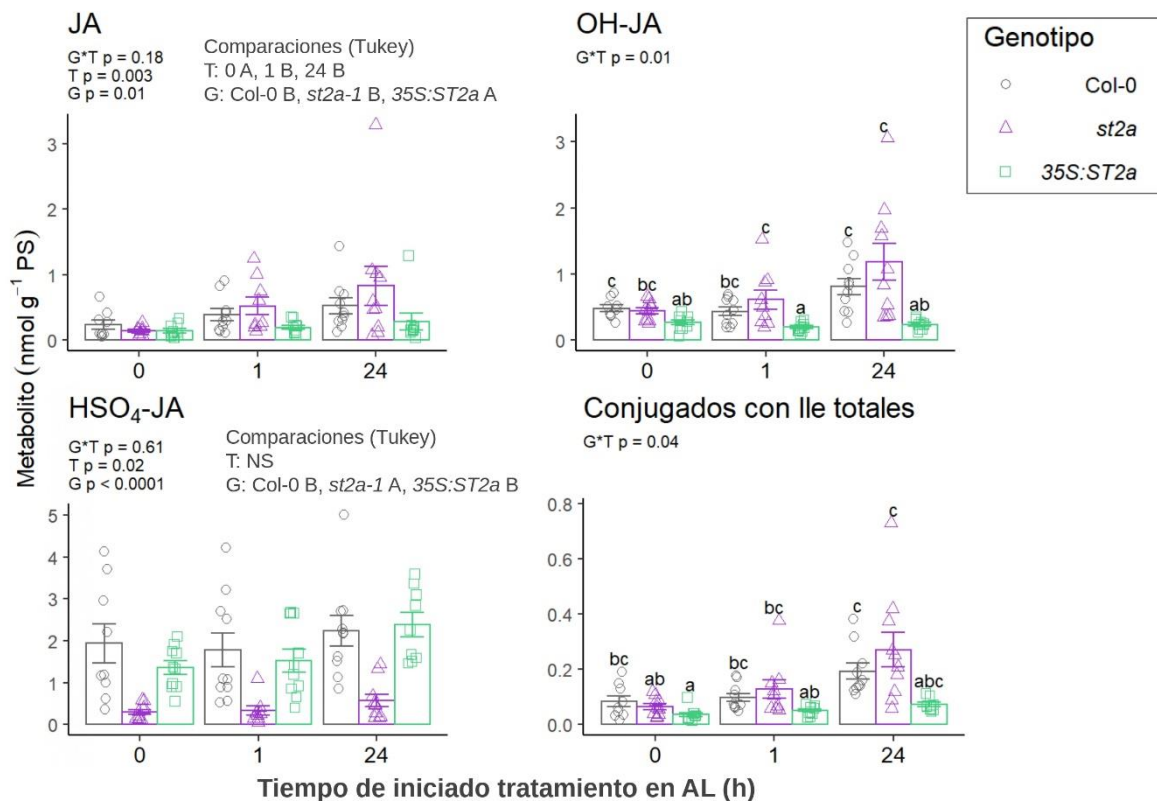


Figura 4.5. El aumento en los jasmonatos bioactivos en respuesta a la alta intensidad de luz está atenuado en plantas *35S:ST2a*. Caracterización de la respuesta a alta intensidad de luz en plantas Col-0, *st2a-1* y *35S:ST2a*. Concentración de JA, OH-JA, $\text{HSO}_4\text{-JA}$ y jasmonatos conjugados con isoleucina (JA-Ile + OH-JA-Ile + COOH-JA-Ile), en plantas control y bajo tratamiento de AL, a la hora y a las 24 horas de iniciado el tratamiento (n = 9/10). Notar que cada panel tiene diferentes valores en el eje y. Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes (cada réplica es un pool de 3 plantas). Se muestran los p-valores del ANOVA, con letras distintas se indican diferencias significativas (Tukey p < 0.05). AL = alta intensidad de luz, PS = peso seco, NS = no significativo (p > 0.05).

Continuamos evaluando la capacidad de responder al tratamiento de alta intensidad de luz, en cuanto a la acumulación de antocianinas, el tamaño de las rosetas y la LMA, en los mismos tres genotipos.

Encontramos que el efecto de la alta intensidad de luz aumentando la concentración de antocianinas dependió del genotipo. En las plantas *35S:ST2a* el aumento en la concentración de antocianinas en respuesta a AL está atenuado (Fig. 4.6.A). El hecho de que plantas *35S:ST2a* presenten un fenotipo similar al de plantas *aos* es consistente con su menor acumulación de jasmonatos conjugados con Ile, y apoya el modelo planteado en el cual el aumento en los jasmonatos bioactivos contribuye a la acumulación de antocianinas en respuesta a AL. Por el contrario, plantas *st2a-1* tienden a acumular más antocianinas que las Col-0 tanto en condiciones control como de alta intensidad lumínica (aunque no llegan a ser diferencias estadísticamente significativas) (Fig. 4.6.A).

Consistente con los resultados obtenidos con plantas *aos*, el efecto del tratamiento sobre la LMA y el área de las rosetas fue independiente del efecto del genotipo (Fig 4.6.B-C). Las plantas *st2a-1* presentaron rosetas más pequeñas que las Col-0, mientras que las *35S:ST2a* presentaron rosetas más grandes (Fig 4.6.B); y las *st2a-1* presentaron una LMA mayor que las *35S:ST2a* (y las Col-0 un fenotipo intermedio) (Fig 4.6.C). Esto es consistente con los trabajos previos que encuentran un rol de los jasmonatos aumentando el LMA (Havko et al., 2016).

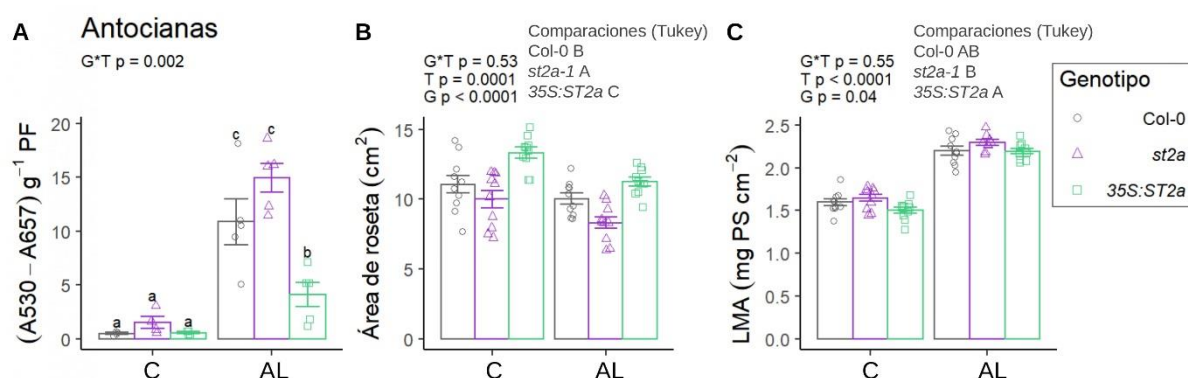


Figura 4.6. El aumento en la concentración de antocianinas en respuesta a alta intensidad de luz está atenuado en plantas *35S:ST2a*. Caracterización de la respuesta a alta intensidad de luz en plantas Col-0 *st2a-1* y *35S:ST2a*. A) Contenido de antocianinas en plantas control y bajo tratamiento de AL, a las 24 h de iniciado el tratamiento (n = 5). B y C) Área de las rosetas (B) y masa foliar por unidad de área (C) en plantas control y bajo tratamiento de AL, a los 3 días de iniciado el tratamiento (n = 10). A, B y C) Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes. Se muestran los p-valores del ANOVA, letras distintas indican diferencias significativas (Tukey p < 0.05). C = condiciones control, AL = alta intensidad de luz, PF = peso fresco, PS = peso seco.

Pensamos que en condiciones de AL plantas *aos* y *35S:ST2a*, que muestran una atenuación en la acumulación de antocianinas, posiblemente se encuentren menos foto-protegidas y esto podría llevar a un mayor estrés oxidativo y producir daño foliar.

Decidimos evaluar el daño foliar causado por un tratamiento de 3 días en AL. No encontramos diferencias significativas entre genotipos en el porcentaje de área foliar dañada (Fig 4.7.A-D). Incluso se puede observar una tendencia (que no llega a ser estadísticamente significativa) a que las *st2a-1* presenten un mayor daño que las Col-0 y *35S:ST2a* (Fig 4.7.A-B); y las *aos* un

menor daño que las Col-0 (Fig 4.7.C-D). Estas tendencias podrían explicarse por el rol reportado de los jasmonatos en la senescencia y muerte celular programada en respuesta a AL (Beaugelin et al., 2019; Ramel et al., 2013; Shumbe et al., 2016).

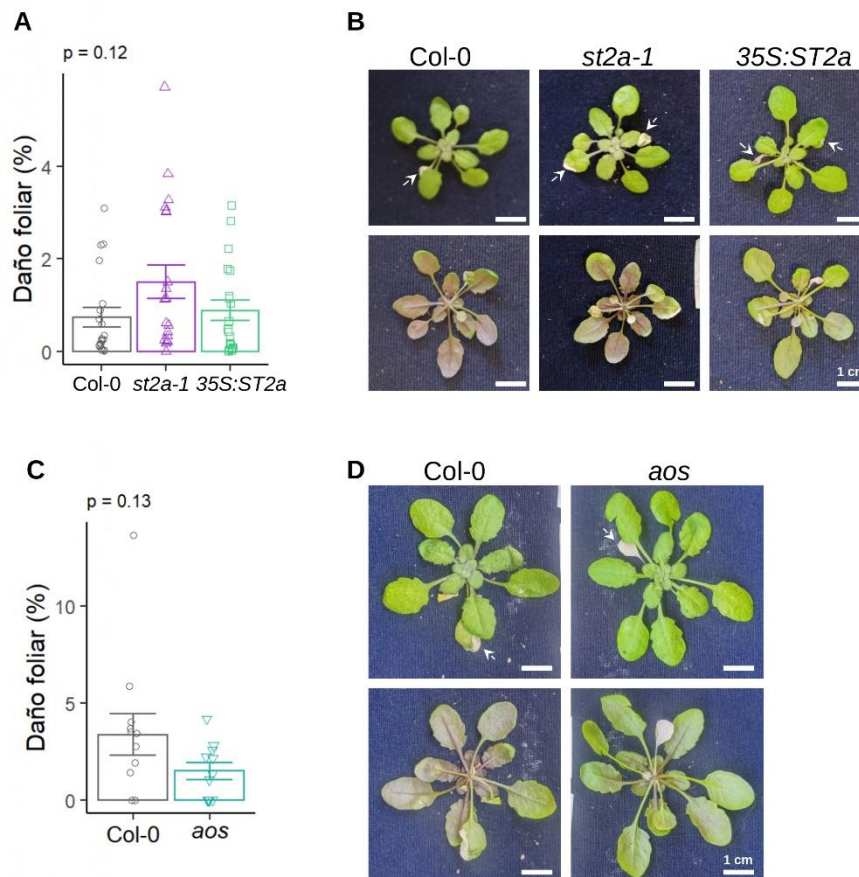


Figura 4.7. El tratamiento de AL produce un daño foliar similar en todos los genotipos. A-C) Porcentaje de área foliar dañada por el tratamiento de AL, a los 3 días de iniciado el tratamiento en plantas Col-0, *st2a-1* y 35S:ST2a (A) o Col-0 y *aos* (C). Las columnas representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos las réplicas biológicas independientes. Se muestran los p-valores del ANOVA (A) o test t-student (C). B-D) Fotografías de una planta representativa de cada genotipo evaluado en A (B) y en C (D). Se muestra la cara adaxial (imágenes superiores) y abaxial (imágenes inferiores), con flechas blancas se indican sectores foliares dañados. En la cara abaxial se notan las diferencias en el contenido de antocianinas entre genotipos.

Dado que en las estimaciones del daño foliar no encontramos diferencias significativas entre genotipos, y pensamos que podemos tener solapados los efectos de una mayor foto-protección por acumulación de antocianinas con los de una mayor muerte celular programada, decidimos estudiar el daño en los fotosistemas. Una forma sencilla de estimar el daño en los fotosistemas es por medio de la fluorescencia de la clorofila. La fluorescencia variable/ fluorescencia máxima (Fv/Fm) es un estimador de la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (Maxwell & Johnson, 2000; Murchie & Lawson, 2013). Evaluamos la Fv/Fm en plantas Col-0, *st2a-1* y 35S:ST2a.

Vimos una clara disminución en la Fv/Fm en respuesta al tratamiento de alta intensidad lumínica (que nos indica que las plantas están sufriendo un estrés que afecta al fotosistema

II), pero no encontramos diferencias entre los genotipos (Fig. 4.8.B). Pese a acumular distintas concentraciones de antocianinas, el daño al fotosistema II causado por altas intensidades de luz resultó ser similar para los 3 genotipos evaluados.

Decidimos estudiar los cambios en el Fv/Fm comparando plantas Col-0 y *aos* a diferentes tiempos de exposición a AL, con el objetivo de definir las condiciones para luego evaluar los otros genotipos. Sin embargo, no encontramos diferencias en el Fv/Fm entre plantas Col-0 y *aos* en ninguno de los tiempos evaluados (transcurridos 1, 2.5, 4, 24, y 48 hs de iniciado el tratamiento de alta intensidad de luz) (Fig 4.8.A).

Pensamos que quizás nuestro tratamiento de alta intensidad de luz no genera un estrés lo suficientemente fuerte como para que las diferencias en la concentración de antocianinas tengan una relevancia en la foto-protección. Por lo tanto, decidimos evaluar el daño al fotosistema II en plantas Col-0 y *aos* sometidas a un estrés mayor. Para ello las plantas crecieron bajo mediasombra y al momento del tratamiento se pasaron al sol pleno en el campo experimental. Con este tratamiento logramos producir un estrés más intenso, que causó un mayor daño en el fotosistema II (reflejado en una mayor disminución del Fv/Fm), pero no encontramos que afecte más a las plantas *aos* que a las Col-0 (Fig 4.8.C).

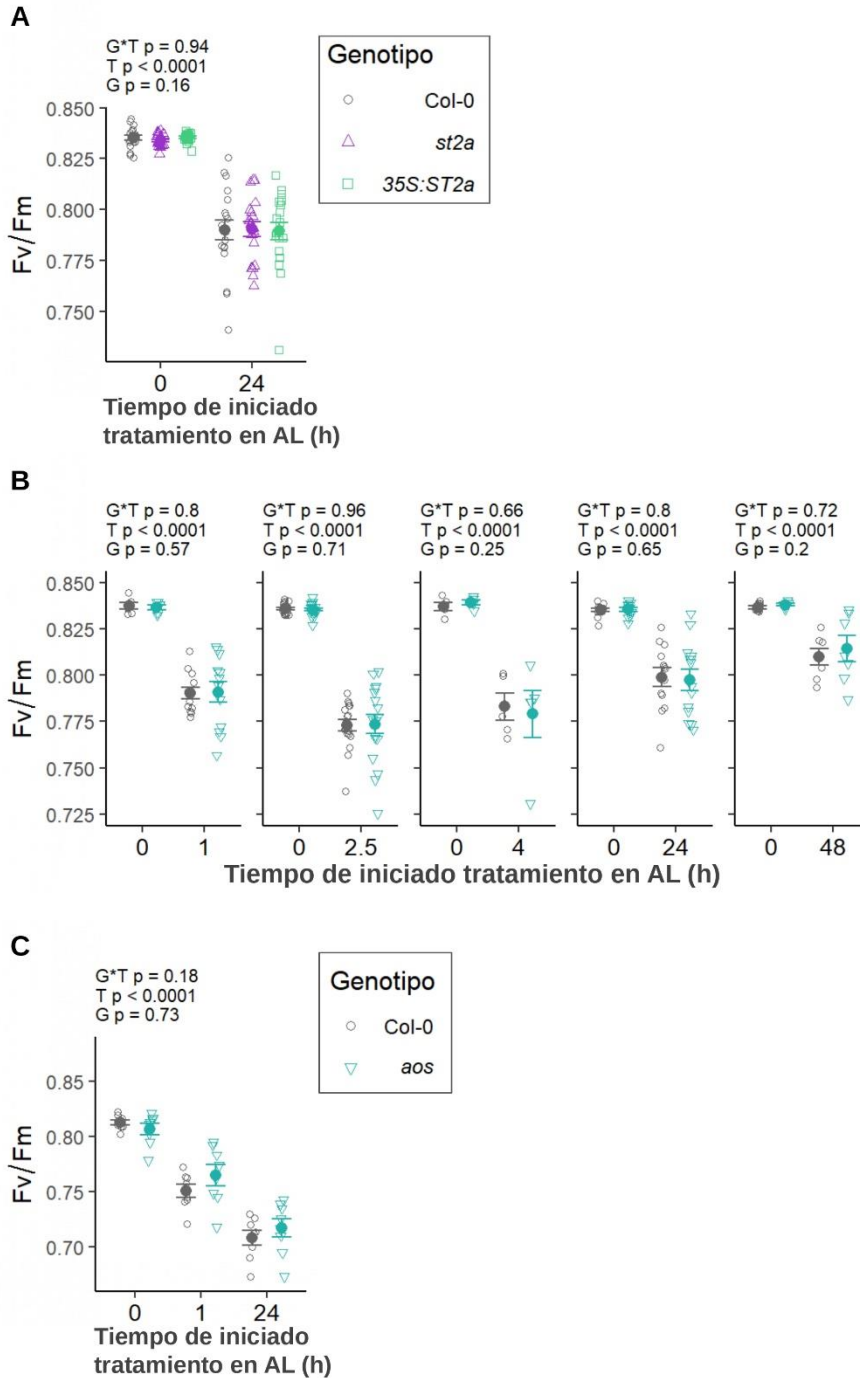


Figura 4.8. El tratamiento de AL produce una reducción en el Fv/Fm similar en todos los genotipos. A) Fv/Fm en plantas Col-0, *st2a-1* y *35S:ST2a*, en condiciones control y bajo tratamiento de AL, a las 24 h de iniciado el tratamiento. B) Fv/Fm en plantas Col-0 y *aos*, bajo condiciones control y de AL, a distintos tiempos de iniciado el tratamiento de AL (1, 2.5, 4, 24 y 48 hs). C) Fv/Fm en plantas Col-0 y *aos* que crecieron bajo mediasombra, y en plantas que fueron expuestas a luz solar plena, a la hora y a las 24 h de iniciado el tratamiento. A, B y C) Los puntos llenos representan la media, las barras de error el error estándar y los puntos vacíos las réplicas biológicas independientes. Se muestran los p-valores del ANOVA. AL = alta intensidad de luz, Fv/Fm = fluorescencia variable/ fluorescencia máxima.

Discusión y Conclusión

Existen trabajos que vinculan a los jasmonatos con respuestas a alta intensidad de luz. Algunos trabajos reportaron un aumento en el JA y JA-Ile en respuesta a una alta intensidad de luz y otros no detectaron diferencias en estos metabolitos pero reportaron un aumento en su precursor, el OPDA (Balfagón et al., 2019; Beaugelin et al., 2019; Ramel et al., 2013). Estas diferencias posiblemente se deban a distinta intensidad del tratamiento de alta intensidad de luz y tiempos de cosecha. Por otro lado, también se ha reportado de forma consistente un aumento en la expresión de genes marcadores de JA-Ile en respuesta a altas intensidades de luz (Balfagón et al., 2019; Gollan & Aro, 2020; Huang et al., 2019). Nuestros resultados fueron consistentes con estos antecedentes, ya que observamos un aumento en la concentración de jasmonatos conjugados con Ile y en la expresión de *VSP1*, gen marcador inducido por JA-Ile (Fig 4.3.A-B).

Si bien parece haber evidencia que vincula a los jasmonatos con las respuestas a alta intensidad de luz, su rol no está muy claro. Por un lado, parece estar involucrado junto con el SA en promover la muerte celular programada en respuesta a alta irradiancia. Esto lleva a que mutantes incapaces de acumular jasmonatos presenten una atenuación en la muerte celular en respuesta a alta intensidad de luz, y un menor daño foliar y de estrés oxidativo (Beaugelin et al., 2019; Ramel et al., 2013; Shumbe et al., 2016). Sin embargo, en otros trabajos se reportó que plantas incapaces de acumular jasmonatos presentan un mayor daño foliar y en los fotosistemas en respuesta a altas intensidades de luz (Balfagón et al., 2019; Savchenko et al., 2017; Youssef et al., 2010). Parece estar claro que los jasmonatos aumentan en respuesta a altas intensidades de luz, pero pareciera ser que dependiendo del contexto (intensidad, tiempo de tratamiento, combinación con otros estreses) esto puede contribuir a inducir mecanismos de foto-protección, y/o puede implicar un mayor daño por estrés oxidativo y muerte celular programada.

Es interesante que en base a nuestros resultados pudimos vincular al aumento en los jasmonatos en AL con la acumulación de antocianas (Fig 4.4.A y 4.6.A). Hasta donde sabemos, no está reportada la dependencia de los jasmonatos en la acumulación de antocianas en respuesta a altas intensidades de luz (Araguirang & Richter, 2022). En base a la función de las antocianas en la foto-protección, esperábamos que, al promover la acumulación de estos pigmentos, la vía del JA-Ile contribuya a la foto-protección de las plantas. Sin embargo, plantas incapaces de acumular jasmonatos y con una menor concentración de antocianinas en respuesta al estrés por AL, presentaron una disminución en la eficiencia del fotosistema II similar a las plantas salvajes (Fig 4.8 A-C).

Creemos que los resultados obtenidos podrían explicarse porque 1) en los tiempos/intensidad del estrés por AL evaluados las diferencias en la acumulación de antocianas entre genotipos no son suficientes para tener un rol relevante en la foto-protección y/o 2) los jasmonatos a la vez que promueven la acumulación de antocianinas restringen otros mecanismos de foto-protección por lo que en el balance plantas que acumulan o no jasmonatos en nuestras condiciones se encuentran igual de foto-protegidas.

En un futuro sería interesante evaluar si en AL los jasmonatos afectan a otros mecanismos de foto-protección, como la actividad de enzimas antioxidantes y/o el ciclo de las xantófilas.

Referencias

- Abdul Malik, N. A., Kumar, I. S., & Nadarajah, K. (2020). Elicitor and Receptor Molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 963. <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>
- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R. A., & Mengiste, T. (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in Arabidopsis response to *Botrytis* infection. *The Plant Journal*, 48(1), 28–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02849.x>
- Acevedo, F. E., Rivera-Vega, L. J., Chung, S. H., Ray, S., & Felton, G. W. (2015). Cues from chewing insects—The intersection of DAMPs, HAMPs, MAMPs and effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.029>
- Agrawal, A. A., & Fishbein, M. (2008). Phylogenetic escalation and decline of plant defense strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 10057–10060. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802368105>
- Ali, J., Covaci, A. D., Roberts, J. M., Sobhy, I. S., Kirk, W. D. J., & Bruce, T. J. A. (2021). Effects of cis-Jasmone Treatment of Brassicas on Interactions With *Myzus persicae* Aphids and Their Parasitoid *Diaeretiella rapae*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 711896. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.711896>
- Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R. C., & Audenaert, K. (2018). Green leaf volatile production by plants: A meta-analysis. *New Phytologist*, 220(3), 666–683. <https://doi.org/10.1111/nph.14671>
- Araguirang, G. E., & Richter, A. S. (2022). Activation of anthocyanin biosynthesis in high light – what is the initial signal? *New Phytologist*, 236(6), 2037–2043. <https://doi.org/10.1111/nph.18488>
- Badri, D. V., De-la-Peña, C., Lei, Z., Manter, D. K., Chaparro, J. M., Guimarães, R. L., Sumner, L. W., & Vivanco, J. M. (2012). Root Secreted Metabolites and Proteins Are Involved in the Early Events of Plant-Plant Recognition Prior to Competition. *PLoS ONE*, 7(10), e46640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046640>
- Baldwin, I. T. (1998). Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14), 8113–8118. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8113>
- Baldwin, I. T., & Schultz, J. C. (1983). Rapid Changes in Tree Leaf Chemistry Induced by Damage: Evidence for Communication Between Plants. *Science*, 221(4607), 277–279. <https://doi.org/10.1126/science.221.4607.277>
- Balfagón, D., Sengupta, S., Gómez-Cadenas, A., Fritsch, F. B., Azad, R. K., Mittler, R., & Zandalinas, S. I. (2019). Jasmonic Acid Is Required for Plant Acclimation to a Combination of High Light and Heat Stress. *Plant Physiology*, 181(4), 1668–1682. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00956>
- Ballaré, C. L., & Austin, A. T. (2019). Recalculating growth and defense strategies under competition: Key roles of photoreceptors and jasmonates. *Journal of Experimental Botany*, 70(13), 3425–3434. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz237>

- Ballaré, C. L., Mazza, C. A., Austin, A. T., & Pierik, R. (2012). Canopy Light and Plant Health. *Plant Physiology*, 160(1), 145–155. <https://doi.org/10.1104/pp.112.200733>
- Ballaré, C. L., & Pierik, R. (2017). The shade-avoidance syndrome: Multiple signals and ecological consequences. *Plant, Cell & Environment*, 40(11), 2530–2543. <https://doi.org/10.1111/pce.12914>
- Ballaré, C. L., Scopel, A. L., & Sánchez, R. A. (1990). Far-Red Radiation Reflected from Adjacent Leaves: An Early Signal of Competition in Plant Canopies. *Science*, 247(4940), 329–332. <https://doi.org/10.1126/science.247.4940.329>
- Ballhorn, D. J., Godschalx, A. L., Smart, S. M., Kautz, S., & Schädler, M. (2014). Chemical defense lowers plant competitiveness. *Oecologia*, 176(3), 811–824. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3036-1>
- Beaugelin, I., Chevalier, A., D'Alessandro, S., Ksas, B., Novák, O., Strnad, M., Forzani, C., Hirt, H., Havaux, M., & Monnet, F. (2019). OXI1 and DAD Regulate Light-Induced Cell Death Antagonistically through Jasmonate and Salicylate Levels. *Plant Physiology*, 180(3), 1691–1708. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00353>
- Bekaert, M., Edger, P. P., Hudson, C. M., Pires, J. C., & Conant, G. C. (2012). Metabolic and evolutionary costs of herbivory defense: Systems biology of glucosinolate synthesis. *New Phytologist*, 196(2), 596–605. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04302.x>
- Biernaskie, J. M. (2022). Kin selection theory and the design of cooperative crops. *Evolutionary Applications*, 15(10), 1555–1564. <https://doi.org/10.1111/eva.13418>
- Blanco-Touriñán, N., Legris, M., Minguet, E. G., Costigliolo-Rojas, C., Nohales, M. A., Iniesto, E., García-León, M., Pacín, M., Heucken, N., Blomeier, T., Locascio, A., Černý, M., Esteve-Bruna, D., Díez-Díaz, M., Brzobohatý, B., Frerigmann, H., Zurbriggen, M. D., Kay, S. A., Rubio, V., ... Alabadí, D. (2020). COP1 destabilizes DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24), 13792–13799. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907969117>
- Bodnaryk, R. P. (1994). Potent effect of jasmonates on indole glucosinolates in oilseed rape and mustard. *Phytochemistry*, 35(2), 301–305. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94752-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94752-6)
- Bones, A., & Rossiter, J. (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry*, 67(11), 1053–1067. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.024>
- Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Gallemí, M., Cifuentes-Esquivel, N., Molina-Contreras, M. J., Salla-Martret, M., Jikumaru, Y., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., & Martínez-García, J. F. (2014). Plant proximity perception dynamically modulates hormone levels and sensitivity in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 65(11), 2937–2947. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru083>
- Brown, P. D., Tokuhisa, J. G., Reichelt, M., & Gershenzon, J. (2003). Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 62(3), 471–481. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00549-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00549-6)
- Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Chamberlain, K., Woodcock, C. M., Mohib, A., Webster, B., Smart, L. E., Birkett, M. A., Pickett, J. A., & Napier, J. A. (2008). *Cis*-Jasmone induces *Arabidopsis* genes that affect the chemical ecology of multitrophic interactions with aphids and their parasitoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 4553–4558. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710305105>

- Bruce, T. J. A., Smart, L. E., Birch, A. N. E., Blok, V. C., MacKenzie, K., Guerrieri, E., Cascone, P., Luna, E., & Ton, J. (2017). Prospects for plant defence activators and biocontrol in IPM – Concepts and lessons learnt so far. *Crop Protection*, 97, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.10.003>
- Buswell, W., Schwarzenbacher, R. E., Luna, E., Sellwood, M., Chen, B., Flors, V., Pétriacq, P., & Ton, J. (2018). Chemical priming of immunity without costs to plant growth. *New Phytologist*, 218(3), 1205–1216. <https://doi.org/10.1111/nph.15062>
- Caarls, L., Elberse, J., Awwanah, M., Ludwig, N. R., De Vries, M., Zeilmaker, T., Van Wees, S. C. M., Schuurink, R. C., & Van Den Ackerveken, G. (2017). *Arabidopsis* JASMONATE-INDUCED OXYGENASES down-regulate plant immunity by hydroxylation and inactivation of the hormone jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(24), 6388–6393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701101114>
- Caffaro, M. M., Vivanco, J. M., Botto, J., & Rubio, G. (2013). Root architecture of *Arabidopsis* is affected by competition with neighbouring plants. *Plant Growth Regulation*, 70(2), 141–147. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9786-7>
- Campos, M. L., Yoshida, Y., Major, I. T., De Oliveira Ferreira, D., Weraduwage, S. M., Froehlich, J. E., Johnson, B. F., Kramer, D. M., Jander, G., Sharkey, T. D., & Howe, G. A. (2016). Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nature Communications*, 7(1), 12570. <https://doi.org/10.1038/ncomms12570>
- Cargnel, M. D., Demkura, P. V., & Ballaré, C. L. (2014). Linking phytochrome to plant immunity: Low red : far-red ratios increase *Arabidopsis* susceptibility to *Botrytis cinerea* by reducing the biosynthesis of indolic glucosinolates and camalexin. *New Phytologist*, 204(2), 342–354. <https://doi.org/10.1111/nph.13032>
- Casal, J. J. (2012). Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book*, 10, e0157. <https://doi.org/10.1199/tab.0157>
- Cerrudo, I., Caliri-Ortiz, M. E., Keller, M. M., Degano, M. E., Demkura, P. V., & Ballaré, C. L. (2017). Exploring growth-defence trade-offs in *Arabidopsis*: Phytochrome B inactivation requires JAZ10 to suppress plant immunity but not to trigger shade-avoidance responses. *Plant, Cell & Environment*, 40(5), 635–644. <https://doi.org/10.1111/pce.12877>
- Chan, C. (2022). Progress in Salicylic Acid-Dependent Signaling for Growth–Defense Trade-Off. *Cells*, 11(19), 2985. <https://doi.org/10.3390/cells11192985>
- Chehab, E. W., Yao, C., Henderson, Z., Kim, S., & Braam, J. (2012). *Arabidopsis* Touch-Induced Morphogenesis Is Jasmonate Mediated and Protects against Pests. *Current Biology*, 22(8), 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.061>
- Chen, B. J. W., Hajiboland, R., Bahrami-Rad, S., Moradtalab, N., & Anten, N. P. R. (2019). Presence of Belowground Neighbors Activates Defense Pathways at the Expense of Growth in Tobacco Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 751. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00751>
- Chhajer, S., Mostafa, I., He, Y., Abou-Hashem, M., El-Domiaty, M., & Chen, S. (2020). Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense. *Agronomy*, 10(11), 1786. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111786>
- Chico, J.-M., Fernández-Barbero, G., Chini, A., Fernández-Calvo, P., Díez-Díaz, M., & Solano, R. (2014). Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein

Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(5), 1967–1980. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.125047>

- Chini, A., Monte, I., Zamarreño, A. M., Hamberg, M., Lassueur, S., Reymond, P., Weiss, S., Stintzi, A., Schaller, A., Porzel, A., García-Mina, J. M., & Solano, R. (2018). An OPR3-independent pathway uses 4,5-didehydrojasmonate for jasmonate synthesis. *Nature Chemical Biology*, 14(2), 171–178. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2540>
- Cipollini, D., Walters, D., & Voelckel, C. (2017). Costs of Resistance in Plants: From Theory to Evidence. In J. A. Roberts (Ed.), *Annual Plant Reviews online* (pp. 263–307). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0512>
- Cossani, C. M., & Sadras, V. O. (2021). Symmetric response to competition in binary mixtures of cultivars associates with genetic gain in wheat yield. *Evolutionary Applications*, 14(8), 2064–2078. <https://doi.org/10.1111/eva.13265>
- Craine, J. M. (2005). Reconciling plant strategy theories of Grime and Tilman: *Reconciling plant strategy theories*. *Journal of Ecology*, 93(6), 1041–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2005.01043.x>
- Creissen, H. E., Jorgensen, T. H., & Brown, J. K. M. (2016). Impact of disease on diversity and productivity of plant populations. *Functional Ecology*, 30(4), 649–657. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12552>
- Darwish, E., Ghosh, R., Ontiveros-Cisneros, A., Tran, H. C., Petersson, M., De Milde, L., Broda, M., Goossens, A., Van Moerkercke, A., Khan, K., & Van Aken, O. (2022). Touch signaling and thigmomorphogenesis are regulated by complementary CAMTA3- and JA-dependent pathways. *Science Advances*, 8(20), eabm2091. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm2091>
- De Lucas, M., Davière, J.-M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blázquez, M. A., Titarenko, E., & Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 451(7177), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature06520>
- De Vries, J., Evers, J. B., & Poelman, E. H. (2017). Dynamic Plant–Plant–Herbivore Interactions Govern Plant Growth–Defence Integration. *Trends in Plant Science*, 22(4), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.006>
- De Wit, M., Kegge, W., Evers, J. B., Vergeer-van Eijk, M. H., Gankema, P., Voesenek, L. A. C. J., & Pierik, R. (2012). Plant neighbor detection through touching leaf tips precedes phytochrome signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(36), 14705–14710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205437109>
- De Wit, M., Keuskamp, D. H., Bongers, F. J., Hornitschek, P., Gommers, C. M. M., Reinen, E., Martínez-Cerón, C., Fankhauser, C., & Pierik, R. (2016). Integration of Phytochrome and Cryptochrome Signals Determines Plant Growth during Competition for Light. *Current Biology*, 26(24), 3320–3326. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.031>
- De Wit, M., Spoel, S. H., Sanchez-Perez, G. F., Gommers, C. M. M., Pieterse, C. M. J., Voesenek, L. A. C. J., & Pierik, R. (2013). Perception of low red:far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 75(1), 90–103. <https://doi.org/10.1111/tpj.12203>

- Delfin, J. C., Kanno, Y., Seo, M., Kitaoka, N., Matsuura, H., Tohge, T., & Shimizu, T. (2022). ATGH3 .10 is another jasmonic acid-amido synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 110(4), 1082–1096. <https://doi.org/10.1111/tpj.15724>
- Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Amiard, V., Van Zadelhoff, G., Veldink, G. A., Muller, O., & Adams, W. W. (2013). Emerging trade-offs – impact of photoprotectants (PsbS, xanthophylls, and vitamin E) on oxylipins as regulators of development and defense. *New Phytologist*, 197(3), 720–729. <https://doi.org/10.1111/nph.12100>
- Dietrich, R., Ploss, K., & Heil, M. (2005). Growth responses and fitness costs after induction of pathogen resistance depend on environmental conditions. *Plant, Cell & Environment*, 28(2), 211–222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01265.x>
- Donald, C. M. (1968). The breeding of crop ideotypes. *Euphytica*, 17(3), 385–403. <https://doi.org/10.1007/BF00056241>
- Donald, C. M., & Hamblin, J. (1983). The Convergent Evolution of Annual Seed Crops in Agriculture. In *Advances in Agronomy* (Vol. 36, pp. 97–143). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60353-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60353-3)
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I. I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., Berger, S., Schuenemann, D., & Mueller, M. J. (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1 Lipases Are Not Essential for Wound- and Pathogen-Induced Jasmonate Biosynthesis: Redundant Lipases Contribute to Jasmonate Formation. *Plant Physiology*, 153(1), 114–127. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155093>
- Erb, M., & Reymond, P. (2019). Molecular Interactions Between Plants and Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 527–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095910>
- Falik, O., Mordoch, Y., Ben-Natan, D., Vanunu, M., Goldstein, O., & Novoplansky, A. (2012). Plant responsiveness to root–root communication of stress cues. *Annals of Botany*, 110(2), 271–280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs045>
- Feng, Q., Li, L., Liu, Y., Shao, X., & Li, X. (2021). Jasmonate regulates the FAMA/mediator complex subunit 8-THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 1 cascade and myrosinase activity. *Plant Physiology*, 187(2), 963–980. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab283>
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J. M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M. I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., De Jaeger, G., & Solano, R. (2011). The *Arabidopsis* bHLH Transcription Factors MYC3 and MYC4 Are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701–715. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080788>
- Fernández-Milmanda, G. L. (2023). Rise of signaling: Jasmonic and salicylic acid oppositely control reactive oxygen species wave production. *Plant Physiology*, 191(2), 814–816. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac517>
- Fernández-Milmanda, G. L., & Ballaré, C. L. (2021). Shade Avoidance: Expanding the Color and Hormone Palette. *Trends in Plant Science*, 26(5), 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.12.006>
- Fernández-Milmanda, G. L., Crocco, C. D., Reichelt, M., Mazza, C. A., Köllner, T. G., Zhang, T., Cargnel, M. D., Lichy, M. Z., Fiorucci, A.-S., Fankhauser, C., Koo, A. J., Austin, A. T., Gershenzon, J., & Ballaré, C. L.

- (2020). A light-dependent molecular link between competition cues and defence responses in plants. *Nature Plants*, 6(3), 223–230. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0604-8>
- Ferrari, S., Plotnikova, J. M., De Lorenzo, G., & Ausubel, F. M. (2003). *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. *The Plant Journal*, 35(2), 193–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01794.x>
- Fiorucci, A.-S., & Fankhauser, C. (2017). Plant Strategies for Enhancing Access to Sunlight. *Current Biology*, 27(17), R931–R940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.085>
- Förster, S., Schmidt, L. K., Kopic, E., Anschütz, U., Huang, S., Schlücking, K., Köster, P., Waadt, R., Larrieu, A., Batistič, O., Rodriguez, P. L., Grill, E., Kudla, J., & Becker, D. (2019). Wounding-Induced Stomatal Closure Requires Jasmonate-Mediated Activation of GORK K⁺ Channels by a Ca²⁺ Sensor-Kinase CBL1-CIPK5 Complex. *Developmental Cell*, 48(1), 87–99.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.014>
- Fraser, D. P., Hayes, S., & Franklin, K. A. (2016). Photoreceptor crosstalk in shade avoidance. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.008>
- Fu, W., Jin, G., Jiménez-Alemán, G. H., Wang, X., Song, J., Li, S., Lou, Y., & Li, R. (2022). The jasmonic acid-amino acid conjugates JA-VAL and JA-LEU are involved in rice resistance to herbivores. *Plant, Cell & Environment*, 45(1), 262–272. <https://doi.org/10.1111/pce.14202>
- Fukazawa, J., Mori, K., Ando, H., Mori, R., Kanno, Y., Seo, M., & Takahashi, Y. (2023). Jasmonate inhibits plant growth and reduces gibberellin levels via *microRNA5998* and transcription factor MYC2. *Plant Physiology*, 193(3), 2197–2214. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad453>
- Gao, Y., Li, Z., Yang, C., Li, G., Zeng, H., Li, Z., Zhang, Y., & Yang, X. (2022). *Pseudomonas syringae* activates ZAT18 to inhibit salicylic acid accumulation by repressing *EDS1* transcription for bacterial infection. *New Phytologist*, 233(3), 1274–1288. <https://doi.org/10.1111/nph.17870>
- Garcia, A., Martinez, M., Diaz, I., & Santamaria, M. E. (2021). The Price of the Induced Defense Against Pests: A Meta-Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 11, 615122. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.615122>
- Ge, D., Yeo, I.-C., & Shan, L. (2022). Knowing me, knowing you: Self and non-self recognition in plant immunity. *Essays in Biochemistry*, 66(5), 447–458. <https://doi.org/10.1042/EBC20210095>
- Gershenzon, J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *Journal of Chemical Ecology*, 20(6), 1281–1328. <https://doi.org/10.1007/BF02059810>
- Gidda, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C., & Varin, L. (2003). Biochemical and Molecular Characterization of a Hydroxyjasmonate Sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 17895–17900. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211943200>
- Gimenez-Ibanez, S., Boter, M., Ortigosa, A., García-Casado, G., Chini, A., Lewsey, M. G., Ecker, J. R., Ntoukakis, V., & Solano, R. (2017). JAZ 2 controls stomata dynamics during bacterial invasion. *New Phytologist*, 213(3), 1378–1392. <https://doi.org/10.1111/nph.14354>
- Glawe, G. A., Zavala, J. A., Kessler, A., Van Dam, N. M., & Baldwin, I. T. (2003). ECOLOGICAL COSTS AND BENEFITS CORRELATED WITH TRYPSIN PROTEASE INHIBITOR PRODUCTION IN NICOTIANA ATTENUATA. *Ecology*, 84(1), 79–90. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[0079:ECABCW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[0079:ECABCW]2.0.CO;2)

- Gollan, P. J., & Aro, E.-M. (2020). Photosynthetic signalling during high light stress and recovery: Targets and dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1801), 20190406. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0406>
- Guo, Q., Major, I. T., Kapali, G., & Howe, G. A. (2022). MYC transcription factors coordinate tryptophan-dependent defence responses and compromise seed yield in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 236(1), 132–145. <https://doi.org/10.1111/nph.18293>
- Guo, Q., Yoshida, Y., Major, I. T., Wang, K., Sugimoto, K., Kapali, G., Havko, N. E., Benning, C., & Howe, G. A. (2018). JAZ repressors of metabolic defense promote growth and reproductive fitness in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(45). <https://doi.org/10.1073/pnas.1811828115>
- Guo, R., Shen, W., Qian, H., Zhang, M., Liu, L., & Wang, Q. (2013). Jasmonic acid and glucose synergistically modulate the accumulation of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5707–5719. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert348>
- Gust, A. A., Pruitt, R., & Nürnberger, T. (2017). Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. *Trends in Plant Science*, 22(9), 779–791. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.005>
- Han, X., Hu, Y., Zhang, G., Jiang, Y., Chen, X., & Yu, D. (2018). Jasmonate Negatively Regulates Stomatal Development in *Arabidopsis* Cotyledons. *Plant Physiology*, 176(4), 2871–2885. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00444>
- Havko, N., Major, I., Jewell, J., Attaran, E., Browse, J., & Howe, G. (2016). Control of Carbon Assimilation and Partitioning by Jasmonate: An Accounting of Growth–Defense Tradeoffs. *Plants*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.3390/plants5010007>
- Hayes, S., Velanis, C. N., Jenkins, G. I., & Franklin, K. A. (2014). UV-B detected by the UVR8 photoreceptor antagonizes auxin signaling and plant shade avoidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32), 11894–11899. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403052111>
- Heil, M. (2008). Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytologist*, 178(1), 41–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02330.x>
- Heitz, T. (2021). Lipids | Jasmonate Metabolism: Shaping Signals for Plant Stress Adaptation and Development. In *Encyclopedia of Biological Chemistry III* (pp. 790–803). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00019-0>
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., Werck-Reichhart, D., & Pinot, F. (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 Catalyze Two Successive Oxidation Steps of Plant Hormone Jasmonoyl-isoleucine for Catabolic Turnover. *Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6296–6306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316364>
- Hisamatsu, T., King, R. W., Helliwell, C. A., & Koshioka, M. (2005). The Involvement of Gibberellin 20-Oxidase Genes in Phytochrome-Regulated Petiole Elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138(2), 1106–1116. <https://doi.org/10.1104/pp.104.059055>
- Hopkins, R. J., Van Dam, N. M., & Van Loon, J. J. A. (2009). Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 57–83. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090623>

- Hou, X., Lee, L. Y. C., Xia, K., Yan, Y., & Yu, H. (2010). DELLAs Modulate Jasmonate Signaling via Competitive Binding to JAZs. *Developmental Cell*, 19(6), 884–894. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.024>
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 41–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825>
- Howe, G. A., Major, I. T., & Koo, A. J. (2018). Modularity in Jasmonate Signaling for Multistress Resilience. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 387–415. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040047>
- Hu, P., Zhou, W., Cheng, Z., Fan, M., Wang, L., & Xie, D. (2013). JAV1 Controls Jasmonate-Regulated Plant Defense. *Molecular Cell*, 50(4), 504–515. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.027>
- Huang, H., Liu, B., Liu, L., & Song, S. (2017). Jasmonate action in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1349–1359. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw495>
- Huang, J., Zhao, X., & Chory, J. (2019). The Arabidopsis Transcriptome Responds Specifically and Dynamically to High Light Stress. *Cell Reports*, 29(12), 4186–4199.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.051>
- Huber, M., Nieuwendijk, N. M., Pantazopoulou, C. K., & Pierik, R. (2021). Light signalling shapes plant–plant interactions in dense canopies. *Plant, Cell & Environment*, 44(4), 1014–1029. <https://doi.org/10.1111/pce.13912>
- Hunziker, P., Lambertz, S. K., Weber, K., Crocoll, C., Halkier, B. A., & Schulz, A. (2021). Herbivore feeding preference corroborates optimal defense theory for specialized metabolites within plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(47), e2111977118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111977118>
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. (2001). The *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1* Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 13(10), 2191–2209. <https://doi.org/10.1105/tpc.010192>
- Jeschke, V., Kearney, E. E., Schramm, K., Kunert, G., Shekhov, A., Gershenzon, J., & Vassão, D. G. (2017). How Glucosinolates Affect Generalist Lepidopteran Larvae: Growth, Development and Glucosinolate Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1995. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01995>
- Jiang, H.-W., Peng, K.-C., Hsu, T.-Y., Chiou, Y.-C., & Hsieh, H.-L. (2023). Arabidopsis FIN219/JAR1 interacts with phytochrome A under far-red light and jasmonates in regulating hypocotyl elongation via a functional demand manner. *PLOS Genetics*, 19(5), e1010779. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010779>
- Jimenez Aleman, G. H., Thirumalaikumar, V. P., Jander, G., Fernie, A. R., & Skirycz, A. (2022). OPDA, more than just a jasmonate precursor. *Phytochemistry*, 204, 113432. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113432>
- Jimenez-Aleman, G. H., Almeida-Trapp, M., Fernández-Barbero, G., Gimenez-Ibanez, S., Reichelt, M., Vadassery, J., Mithöfer, A., Caballero, J., Boland, W., & Solano, R. (2019). Omega hydroxylated JA-Ile is an endogenous bioactive jasmonate that signals through the canonical jasmonate signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(12), 158520. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.158520>

- Jin, G., Qi, J., Zu, H., Liu, S., Gershenzon, J., Lou, Y., Baldwin, I. T., & Li, R. (2023). Jasmonate-mediated gibberellin catabolism constrains growth during herbivore attack in rice. *The Plant Cell*, koad191. <https://doi.org/10.1093/plcell/koad191>
- Johnson, L. Y. D., Major, I. T., Chen, Y., Yang, C., Vanegas-Cano, L. J., & Howe, G. A. (2023). Diversification of JAZ-MYC signaling function in immune metabolism. *New Phytologist*, nph.19114. <https://doi.org/10.1111/nph.19114>
- Kegge, W., Ninkovic, V., Glinwood, R., Welschen, R. A. M., Voeselek, L. A. C. J., & Pierik, R. (2015). Red:far-red light conditions affect the emission of volatile organic compounds from barley (*Hordeum vulgare*), leading to altered biomass allocation in neighbouring plants. *Annals of Botany*, 115(6), 961–970. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv036>
- Keller, M. M., Jaillais, Y., Pedmale, U. V., Moreno, J. E., Chory, J., & Ballaré, C. L. (2011). Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in Arabidopsis via partially independent hormonal cascades. *The Plant Journal*, 67(2), 195–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04598.x>
- Khan, G. A., Vogiatzaki, E., Glauser, G., & Poirier, Y. (2016). Phosphate Deficiency Induces the Jasmonate Pathway and Enhances Resistance to Insect Herbivory. *Plant Physiology*, 171(1), 632–644. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00278>
- Kimberlin, A., Holtsclaw, R. E., & Koo, A. J. (2021). Differential Regulation of the Ribosomal Association of mRNA Transcripts in an Arabidopsis Mutant Defective in Jasmonate-Dependent Wound Response. *Frontiers in Plant Science*, 12, 637959. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.637959>
- Kimberlin, A. N., Holtsclaw, R. E., Zhang, T., Mulaudzi, T., & Koo, A. J. (2022). On the initiation of jasmonate biosynthesis in wounded leaves. *Plant Physiology*, 189(4), 1925–1942. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac163>
- Kong, C.-H., Zhang, S.-Z., Li, Y.-H., Xia, Z.-C., Yang, X.-F., Meiners, S. J., & Wang, P. (2018). Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. *Nature Communications*, 9(1), 3867. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06429-1>
- Koo, A. J. K., Cooke, T. F., & Howe, G. A. (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9298–9303. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103542108>
- Küpers, J. J., Oskam, L., & Pierik, R. (2020). Photoreceptors Regulate Plant Developmental Plasticity through Auxin. *Plants*, 9(8), 940. <https://doi.org/10.3390/plants9080940>
- Lake, L., Li, Y., Casal, J. J., & Sadras, V. O. (2016). Negative association between chickpea response to competition and crop yield: Phenotypic and genetic analysis. *Field Crops Research*, 196, 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.07.021>
- Landi, M., Tattini, M., & Gould, K. S. (2015). Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.012>
- Leivar, P., & Monte, E. (2014). PIFs: Systems Integrators in Plant Development. *The Plant Cell*, 26(1), 56–78. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120857>

- Leivar, P., & Quail, P. H. (2011). PIFs: Pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, 16(1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.003>
- Leone, M., Keller, M. M., Cerrudo, I., & Ballaré, C. L. (2014). To grow or defend? Low red : far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytologist*, 204(2), 355–367. <https://doi.org/10.1111/nph.12971>
- Li, C., Nozue, K., & Maloof, J. N. (2020). MYCs and PIFs Act Independently in Arabidopsis Growth Regulation. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 10(5), 1797–1807. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401188>
- Li, J., Li, G., Wang, H., & Wang Deng, X. (2011). Phytochrome Signaling Mechanisms. *The Arabidopsis Book*, 9, e0148. <https://doi.org/10.1199/tab.0148>
- Li, J., Wang, X., Jiang, R., Dong, B., Fang, S., Li, Q., Lv, Z., & Chen, W. (2021). Phytohormone-Based Regulation of Trichome Development. *Frontiers in Plant Science*, 12, 734776. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.734776>
- Li, L., Li, Z., Lou, Y., Meiners, S. J., & Kong, C. (2023). (-)-Loliolide is a general signal of plant stress that activates jasmonate-related responses. *New Phytologist*, 238(5), 2099–2112. <https://doi.org/10.1111/nph.18644>
- Li, L.-L., Zhao, H.-H., & Kong, C.-H. (2019). (-)-Loliolide, the most ubiquitous lactone, is involved in barnyardgrass-induced rice allelopathy. *Journal of Experimental Botany*, erz497. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz497>
- Li, M., Yu, G., Cao, C., & Liu, P. (2021). Metabolism, signaling, and transport of jasmonates. *Plant Communications*, 2(5), 100231. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100231>
- Li, N., Han, X., Feng, D., Yuan, D., & Huang, L.-J. (2019). Signaling Crosstalk between Salicylic Acid and Ethylene/Jasmonate in Plant Defense: Do We Understand What They Are Whispering? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 671. <https://doi.org/10.3390/ijms20030671>
- Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B., & Niyogi, K. K. (2009). Sensing and Responding to Excess Light. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 239–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844>
- Linkies, A., & Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: How ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports*, 31(2), 253–270. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1180-1>
- Liu, B., Seong, K., Pang, S., Song, J., Gao, H., Wang, C., Zhai, J., Zhang, Y., Gao, S., Li, X., Qi, T., & Song, S. (2021). Functional specificity, diversity, and redundancy of Arabidopsis JAZ family repressors in jasmonate and COI1-regulated growth, development, and defense. *New Phytologist*, 231(4), 1525–1545. <https://doi.org/10.1111/nph.17477>
- Liu, J., Lu, Y., Hua, W., & Last, R. L. (2019). A New Light on Photosystem II Maintenance in Oxygenic Photosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 975. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00975>
- Liu, Y., Ahn, J.-E., Datta, S., Salzman, R. A., Moon, J., Huyghues-Despointes, B., Pittendrigh, B., Murdock, L. L., Koiwa, H., & Zhu-Salzman, K. (2005). Arabidopsis Vegetative Storage Protein Is an Anti-Insect Acid Phosphatase. *Plant Physiology*, 139(3), 1545–1556. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066837>

- Liu, Y., Wei, H., Ma, M., Li, Q., Kong, D., Sun, J., Ma, X., Wang, B., Chen, C., Xie, Y., & Wang, H. (2019). Arabidopsis FHY3 and FAR1 Regulate the Balance between Growth and Defense Responses under Shade Conditions. *The Plant Cell*, 31(9), 2089–2106. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00991>
- Machado, R. A. R., Ferrieri, A. P., Robert, C. A. M., Glauser, G., Kallenbach, M., Baldwin, I. T., & Erb, M. (2013). Leaf-herbivore attack reduces carbon reserves and regrowth from the roots via jasmonate and auxin signaling. *New Phytologist*, 200(4), 1234–1246. <https://doi.org/10.1111/nph.12438>
- Machado, R. A. R., Robert, C. A. M., Arce, C. C. M., Ferrieri, A. P., Xu, S., Jimenez-Aleman, G. H., Baldwin, I. T., & Erb, M. (2016). Auxin Is Rapidly Induced by Herbivore Attack and Regulates a Subset of Systemic, Jasmonate-Dependent Defenses. *Plant Physiology*, 172(1), 521–532. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00940>
- Machado, R. A. R., Zhou, W., Ferrieri, A. P., Arce, C. C. M., Baldwin, I. T., Xu, S., & Erb, M. (2017). Species-specific regulation of herbivory-induced defoliation tolerance is associated with jasmonate inducibility. *Ecology and Evolution*, 7(11), 3703–3712. <https://doi.org/10.1002/ece3.2953>
- Malhotra, B., Kumar, P., & Bisht, N. C. (2023). Defense versus growth trade-offs: Insights from glucosinolates and their catabolites. *Plant, Cell & Environment*, 46(10), 2964–2984. <https://doi.org/10.1111/pce.14462>
- Marquis, V., Smirnova, E., Graindorge, S., Delcros, P., Villette, C., Zumsteg, J., Heintz, D., & Heitz, T. (2022). Broad-spectrum stress tolerance conferred by suppressing jasmonate signaling attenuation in Arabidopsis JASMONIC ACID OXIDASE mutants. *The Plant Journal*, 109(4), 856–872. <https://doi.org/10.1111/tpj.15598>
- Marquis, V., Smirnova, E., Poirier, L., Zumsteg, J., Schweizer, F., Reymond, P., & Heitz, T. (2020). Stress- and pathway-specific impacts of impaired jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) catabolism on defense signalling and biotic stress resistance. *Plant, Cell & Environment*, 43(6), 1558–1570. <https://doi.org/10.1111/pce.13753>
- Matsumura, M., Nomoto, M., Itaya, T., Aratani, Y., Iwamoto, M., Matsuura, T., Hayashi, Y., Mori, T., Skelly, M. J., Yamamoto, Y. Y., Kinoshita, T., Mori, I. C., Suzuki, T., Betsuyaku, S., Spoel, S. H., Toyota, M., & Tada, Y. (2022). Mechanosensory trichome cells evoke a mechanical stimuli-induced immune response in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications*, 13(1), 1216. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28813-8>
- Matthes, M. C., Bruce, T. J. A., Ton, J., Verrier, P. J., Pickett, J. A., & Napier, J. A. (2010). The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in Arabidopsis thaliana and its role in indirect defence. *Planta*, 232(5), 1163–1180. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1244-4>
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—A practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Meldau, S., Ullman-Zeunert, L., Govind, G., Bartram, S., & Baldwin, I. T. (2012). MAPK-dependent JA and SA signalling in Nicotiana attenuata affects plant growth and fitness during competition with conspecifics. *BMC Plant Biology*, 12(1), 213. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-213>
- Mewis, I., Appel, H. M., Hom, A., Raina, R., & Schultz, J. C. (2005). Major Signaling Pathways Modulate Arabidopsis Glucosinolate Accumulation and Response to Both Phloem-Feeding and Chewing Insects. *Plant Physiology*, 138(2), 1149–1162. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053389>

- Mikkelsen, M. D., Petersen, B. L., Glawischnig, E., Jensen, A. B., Andreasson, E., & Halkier, B. A. (2003). Modulation of CYP79 Genes and Glucosinolate Profiles in Arabidopsis by Defense Signaling Pathways. *Plant Physiology*, 131(1), 298–308. <https://doi.org/10.1104/pp.011015>
- Mitchell, C., Brennan, R. M., Graham, J., & Karley, A. J. (2016). Plant Defense against Herbivorous Pests: Exploiting Resistance and Tolerance Traits for Sustainable Crop Protection. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01132>
- Moreno, J. E., Tao, Y., Chory, J., & Ballaré, C. L. (2009). Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4935–4940. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900701106>
- Muñoz-Parra, E., Pelagio-Flores, R., Raya-González, J., Salmerón-Barrera, G., Ruiz-Herrera, L. F., Valencia-Cantero, E., & López-Bucio, J. (2017). Plant-plant interactions influence developmental phase transitions, grain productivity and root system architecture in *Arabidopsis* via auxin and PFT1/MED25 signalling: Auxin and PFT1/MED25 in self plant recognition. *Plant, Cell & Environment*, 40(9), 1887–1899. <https://doi.org/10.1111/pce.12993>
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Myers, R. J., Jr, Fichman, Y., Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2022). Jasmonic acid and salicylic acid modulate systemic reactive oxygen species signaling during stress responses. *Plant Physiology*, kiac449. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac449>
- Nakamura, Y., Mithöfer, A., Kombrink, E., Boland, W., Hamamoto, S., Uozumi, N., Tohma, K., & Ueda, M. (2011). 12-Hydroxyjasmonic Acid Glucoside Is a COI1-JAZ-Independent Activator of Leaf-Closing Movement in *Samanea saman*. *Plant Physiology*, 155(3), 1226–1236. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168617>
- Nakamura, Y., Miyatake, R., Matsubara, A., Kiyota, H., & Ueda, M. (2006). Enantio-differential approach to identify the target cell for glucosyl jasmonate-type leaf-closing factor, by using fluorescence-labeled probe compounds. *Tetrahedron*, 62(37), 8805–8813. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.06.092>
- Naseem, M., Kaldorf, M., & Dandekar, T. (2015). The nexus between growth and defence signalling: Auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4885–4896. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv297>
- Neff, M. M., & Chory, J. (1998). Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B, and Cryptochrome 1 during Arabidopsis Development1. *Plant Physiology*, 118(1), 27–35. <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.27>
- Ninkovic, V., Markovic, D., & Dahlin, I. (2016). Decoding neighbour volatiles in preparation for future competition and implications for tritrophic interactions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 23, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2016.09.005>
- Ninkovic, V., Markovic, D., & Rensing, M. (2021). Plant volatiles as cues and signals in plant communication. *Plant, Cell & Environment*, 44(4), 1030–1043. <https://doi.org/10.1111/pce.13910>

- Noir, S., Bömer, M., Takahashi, N., Ishida, T., Tsui, T.-L., Balbi, V., Shanahan, H., Sugimoto, K., & Devoto, A. (2013). Jasmonate Controls Leaf Growth by Repressing Cell Proliferation and the Onset of Endoreduplication while Maintaining a Potential Stand-By Mode. *Plant Physiology*, 161(4), 1930–1951. <https://doi.org/10.1104/pp.113.214908>
- Ortigosa, A., Fonseca, S., Franco-Zorrilla, J. M., Fernández-Calvo, P., Zander, M., Lewsey, M. G., García-Casado, G., Fernández-Barbero, G., Ecker, J. R., & Solano, R. (2020). The JA-pathway MYC transcription factors regulate photomorphogenic responses by targeting HY5 gene expression. *The Plant Journal*, 102(1), 138–152. <https://doi.org/10.1111/tpj.14618>
- Padilla, F. M., Mommer, L., De Caluwe, H., Smit-Tiekstra, A. E., Wagemaker, C. A. M., Ouborg, N. J., & De Kroon, H. (2013). Early Root Overproduction Not Triggered by Nutrients Decisive for Competitive Success Belowground. *PLoS ONE*, 8(1), e55805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055805>
- Pan, J., Hu, Y., Wang, H., Guo, Q., Chen, Y., Howe, G. A., & Yu, D. (2020). Molecular Mechanism Underlying the Synergetic Effect of Jasmonate on Abscissic Acid Signaling during Seed Germination in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 32(12), 3846–3865. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00838>
- Pantazopoulou, C. K., Bongers, F. J., & Pierik, R. (2021). Reducing shade avoidance can improve Arabidopsis canopy performance against competitors. *Plant, Cell & Environment*, 44(4), 1130–1141. <https://doi.org/10.1111/pce.13905>
- Pantazopoulou, C. K., Buti, S., Nguyen, C. T., Oskam, L., Weits, D. A., Farmer, E. E., Kajala, K., & Pierik, R. (2023). Mechanodetection of neighbor plants elicits adaptive leaf movements through calcium dynamics. *Nature Communications*, 14(1), 5827. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41530-0>
- Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T., Feldmann, K. A., & Feyereisen, R. (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis: A mutation in AOS causes male sterility. *The Plant Journal*, 31(1), 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01328.x>
- Peng, K.-C., Siao, W., & Hsieh, H.-L. (2023). FAR-RED INSENSITIVE 219 and phytochrome B corepress shade avoidance via modulating nuclear speckle formation. *Plant Physiology*, 192(2), 1449–1465. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad103>
- Pérez-Alonso, M.-M., Sánchez-Parra, B., Ortiz-García, P., Santamaría, M. E., Díaz, I., & Pollmann, S. (2021). Jasmonic Acid-Dependent MYC Transcription Factors Bind to a Tandem G-Box Motif in the YUCCA8 and YUCCA9 Promoters to Regulate Biotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9768. <https://doi.org/10.3390/ijms22189768>
- Pierik, R., & Ballaré, C. L. (2021). Control of Plant Growth and Defense by Photoreceptors: From Mechanisms to Opportunities in Agriculture. *Molecular Plant*, 14(1), 61–76. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.021>
- Pieterse, C. M. J., Van Der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 489–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055>
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I. J., & Villar, R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): A meta-analysis. *New Phytologist*, 182(3), 565–588. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02830.x>

- Poudel, A. N., Holtsclaw, R. E., Kimberlin, A., Sen, S., Zeng, S., Joshi, T., Lei, Z., Sumner, L. W., Singh, K., Matsuura, H., & Koo, A. J. (2019). 12-Hydroxy-Jasmonoyl-L-Isoleucine Is an Active Jasmonate That Signals through CORONATINE INSENSITIVE 1 and Contributes to the Wound Response in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 60(10), 2152–2166. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz109>
- Poudel, A. N., Zhang, T., Kwasniewski, M., Nakabayashi, R., Saito, K., & Koo, A. J. (2016). Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in Arabidopsis thaliana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(9), 1396–1408. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.03.006>
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C. M. J., & Memelink, J. (2008). The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiology*, 147(3), 1347–1357. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117523>
- Qi, T., Song, S., Ren, Q., Wu, D., Huang, H., Chen, Y., Fan, M., Peng, W., Ren, C., & Xie, D. (2011). The Jasmonate-ZIM-Domain Proteins Interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB Complexes to Regulate Jasmonate-Mediated Anthocyanin Accumulation and Trichome Initiation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 23(5), 1795–1814. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083261>
- Rahman, Md. M., Mostofa, M. G., Keya, S. S., Ghosh, P. K., Abdelrahman, M., Anik, T. R., Gupta, A., & Tran, L.-S. P. (2024). Jasmonic acid priming augments antioxidant defense and photosynthesis in soybean to alleviate combined heat and drought stress effects. *Plant Physiology and Biochemistry*, 206, 108193. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108193>
- Ramel, F., Ksas, B., Akkari, E., Mialoundama, A. S., Monnet, F., Krieger-Liszkay, A., Ravanat, J.-L., Mueller, M. J., Bouvier, F., & Havaux, M. (2013). Light-Induced Acclimation of the Arabidopsis chlorina1 Mutant to Singlet Oxygen. *The Plant Cell*, 25(4), 1445–1462. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.109827>
- Raza, A., Charagh, S., Zahid, Z., Mubarik, M. S., Javed, R., Siddiqui, M. H., & Hasanuzzaman, M. (2021). Jasmonic acid: A key frontier in conferring abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 40(8), 1513–1541. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02614-z>
- Savchenko, T., Yanykin, D., Khorobrykh, A., Terentyev, V., Klimov, V., & Dehesh, K. (2017). The hydroperoxide lyase branch of the oxylipin pathway protects against photoinhibition of photosynthesis. *Planta*, 245(6), 1179–1192. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2674-z>
- Scholz, S. S., Reichelt, M., Boland, W., & Mithöfer, A. (2015). Additional evidence against jasmonate-induced jasmonate induction hypothesis. *Plant Science*, 239, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.024>
- Schweizer, F., Fernández-Calvo, P., Zander, M., Diez-Diaz, M., Fonseca, S., Glauser, G., Lewsey, M. G., Ecker, J. R., Solano, R., & Reymond, P. (2013). Arabidopsis Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors MYC2, MYC3, and MYC4 Regulate Glucosinolate Biosynthesis, Insect Performance, and Feeding Behavior. *The Plant Cell*, 25(8), 3117–3132. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115139>
- Semchenko, M., Saar, S., & Lepik, A. (2014). Plant root exudates mediate neighbour recognition and trigger complex behavioural changes. *New Phytologist*, 204(3), 631–637. <https://doi.org/10.1111/nph.12930>
- Sestari, I., & Campos, M. L. (2022). Into a dilemma of plants: The antagonism between chemical defenses and growth. *Plant Molecular Biology*, 109(4–5), 469–482. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01213-0>

- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z., & Xie, D. (2009). Molecular mechanism for jasmonate-induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3849–3860. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp223>
- Shi, L., Li, X., Fu, Y., & Li, C. (2023). Environmental Stimuli and Phytohormones in Anthocyanin Biosynthesis: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(22), 16415. <https://doi.org/10.3390/ijms242216415>
- Shi, Y., Ke, X., Yang, X., Liu, Y., & Hou, X. (2022). Plants response to light stress. *Journal of Genetics and Genomics*, 49(8), 735–747. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2022.04.017>
- Shikha, D., Jakhar, P., & Satbhai, S. B. (2023). Role of jasmonate signaling in the regulation of plant responses to nutrient deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 74(4), 1221–1243. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac387>
- Shumbe, L., Chevalier, A., Legeret, B., Taconnat, L., Monnet, F., & Havaux, M. (2016). Singlet Oxygen-Induced Cell Death in *Arabidopsis* under High-Light Stress Is Controlled by OXI1 Kinase. *Plant Physiology*, 170(3), 1757–1771. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01546>
- Smirnova, E., Marquis, V., Poirier, L., Aubert, Y., Zumsteg, J., Ménard, R., Miesch, L., & Heitz, T. (2017). Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against *Botrytis cinerea* Infection. *Molecular Plant*, 10(9), 1159–1173. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.07.010>
- Song, S., Huang, H., Gao, H., Wang, J., Wu, D., Liu, X., Yang, S., Zhai, Q., Li, C., Qi, T., & Xie, D. (2014). Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 Modulates Antagonism between Jasmonate and Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(1), 263–279. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.120394>
- Song, S., Huang, H., Wang, J., Liu, B., Qi, T., & Xie, D. (2017). MYC5 is Involved in Jasmonate-Regulated Plant Growth, Leaf Senescence and Defense Responses. *Plant and Cell Physiology*, 58(10), 1752–1763. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx112>
- Spoel, S. H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 89–100. <https://doi.org/10.1038/nri3141>
- Staswick, P. E. (2009). The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *Plant Physiology*, 150(3), 1310–1321. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138529>
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in *Arabidopsis*[W]. *The Plant Cell*, 16(8), 2117–2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>
- Staswick, P., Rowe, M., Spalding, E. P., & Splitt, B. L. (2017). Jasmonoyl-L-Tryptophan Disrupts IAA Activity through the AUX1 Auxin Permease. *Frontiers in Plant Science*, 8, 736. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00736>
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., & Wasternack, C. (2003). [No title found]. *Plant Molecular Biology*, 51(6), 895–911. <https://doi.org/10.1023/A:1023049319723>

- Swain, S., Jiang, H.-W., & Hsieh, H.-L. (2017). FAR-RED INSENSITIVE 219/JAR1 Contributes to Shade Avoidance Responses of Arabidopsis Seedlings by Modulating Key Shade Signaling Components. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1901. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01901>
- Sweeney, C., Lakshmanan, V., & Bais, H. P. (2017). Interplant Aboveground Signaling Prompts Upregulation of Auxin Promoter and Malate Transporter as Part of Defensive Response in the Neighboring Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00595>
- Szechyńska-Hebda, M., Lewandowska, M., Witoń, D., Fichman, Y., Mittler, R., & Karpiński, S. M. (2022). Aboveground plant-to-plant electrical signaling mediates network acquired acclimation. *The Plant Cell*, 34(8), 3047–3065. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac150>
- Tang, J., Yang, D., Wu, J., Chen, S., & Wang, L. (2020). Silencing JA hydroxylases in *Nicotiana attenuata* enhances jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Spodoptera litura*. *Plant Diversity*, 42(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2019.11.005>
- Thaler, J. S., Humphrey, P. T., & Whiteman, N. K. (2012). Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science*, 17(5), 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.010>
- Troufflard, S., Mullen, W., Larson, T. R., Graham, I. A., Crozier, A., Amtmann, A., & Armengaud, P. (2010). Potassium deficiency induces the biosynthesis of oxylipins and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 172. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-172>
- Ullah, C., Chen, Y.-H., Ortega, M. A., & Tsai, C.-J. (2023). The diversity of salicylic acid biosynthesis and defense signaling in plants: Knowledge gaps and future opportunities. *Current Opinion in Plant Biology*, 72, 102349. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102349>
- Van Dam, N. M., & Baldwin, I. T. (1998). Costs of jasmonate-induced responses in plants competing for limited resources. *Ecology Letters*, 1(1), 30–33. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.1998.00010.x>
- Van Dam, N. M., & Baldwin, I. T. (2001). Competition mediates costs of jasmonate-induced defences, nitrogen acquisition and transgenerational plasticity in *Nicotiana attenuata*: Competition affects costs of induction. *Functional Ecology*, 15(3), 406–415. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.2001.00533.x>
- Van Dijk, L. J. A., Ehrlén, J., & Tack, A. J. M. (2021). Direct and insect-mediated effects of pathogens on plant growth and fitness. *Journal of Ecology*, 109(7), 2769–2779. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13689>
- Van Moerkercke, A., Duncan, O., Zander, M., Šimura, J., Broda, M., Vanden Bossche, R., Lewsey, M. G., Lama, S., Singh, K. B., Ljung, K., Ecker, J. R., Goossens, A., Millar, A. H., & Van Aken, O. (2019). A MYC2/MYC3/MYC4-dependent transcription factor network regulates water spray-responsive gene expression and jasmonate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(46), 23345–23356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1911758116>
- Wang, J., Song, L., Gong, X., Xu, J., & Li, M. (2020). Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1446. <https://doi.org/10.3390/ijms21041446>
- Wang, K., Guo, Q., Froehlich, J. E., Hersh, H. L., Zienkiewicz, A., Howe, G. A., & Benning, C. (2018). Two Abscissic Acid-Responsive Plastid Lipase Genes Involved in Jasmonic Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 30(5), 1006–1022. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00250>

- Wang, L., Halitschke, R., Kang, J.-H., Berg, A., Harnisch, F., & Baldwin, I. T. (2007). Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. *Planta*, 226(1), 159–167. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0477-3>
- Wang, L., Ma, C., Wang, S., Yang, F., Sun, Y., Tang, J., Luo, J., & Wu, J. (2023). Ethylene and jasmonate signaling converge on gibberellin catabolism during thigmomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, kiad556. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad556>
- Wang, N., Kong, C., Wang, P., & Meiners, S. J. (2021). Root exudate signals in plant–plant interactions. *Plant, Cell & Environment*, 44(4), 1044–1058. <https://doi.org/10.1111/pce.13892>
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1306–1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Wasternack, C., & Feussner, I. (2018). The Oxylipin Pathways: Biochemistry and Function. *Annual Review of Plant Biology*, 69(1), 363–386. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040440>
- Wasternack, C., & Song, S. (2016). Jasmonates: Biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany*, erw443. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw443>
- Wasternack, C., & Strnad, M. (2018). Jasmonates: News on Occurrence, Biosynthesis, Metabolism and Action of an Ancient Group of Signaling Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2539. <https://doi.org/10.3390/ijms19092539>
- Wasternack, C., & Strnad, M. (2019). Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites—Pathways, transcription factors and applied aspects—A brief review. *New Biotechnology*, 48, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.007>
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L., & Heitz, T. (2016). Dynamics of Jasmonate Metabolism upon Flowering and across Leaf Stress Responses in Arabidopsis thaliana. *Plants*, 5(1), 4. <https://doi.org/10.3390/plants5010004>
- Wu, J., & Baldwin, I. T. (2009). Herbivory-induced signalling in plants: Perception and action. *Plant, Cell & Environment*, 32(9), 1161–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01943.x>
- Wuest, S. E., Pires, N. D., Luo, S., Vasseur, F., Messier, J., Grossniklaus, U., & Niklaus, P. A. (2022). Increasing plant group productivity through latent genetic variation for cooperation. *PLOS Biology*, 20(11), e3001842. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001842>
- Yamashino, T., Kitayama, M., & Mizuno, T. (2013). Transcription of ST2A Encoding A Sulfotransferase Family Protein That Is Involved in Jasmonic Acid Metabolism Is Controlled According to the Circadian Clock- and PIF4/PIF5-Mediated External Coincidence Mechanism in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(12), 2454–2460. <https://doi.org/10.1271/bbb.130559>
- Yan, J., Li, S., Gu, M., Yao, R., Li, Y., Chen, J., Yang, M., Tong, J., Xiao, L., Nan, F., & Xie, D. (2016). Endogenous Bioactive Jasmonate Is Composed of a Set of (+)-7- iso- JA-Amino Acid Conjugates. *Plant Physiology*, 172(4), 2154–2164. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00906>

- Yang, C., Bai, Y., Halitschke, R., Gase, K., Baldwin, G., & Baldwin, I. T. (2023). Exploring the metabolic basis of growth/defense trade-offs in complex environments with *Nicotiana attenuata* plants cosilenced in *NaMYC2a/b* expression. *New Phytologist*, 238(1), 349–366. <https://doi.org/10.1111/nph.18732>
- Yang, C., & Li, L. (2017). Hormonal Regulation in Shade Avoidance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1527. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01527>
- Yang, D.-L., Yao, J., Mei, C.-S., Tong, X.-H., Zeng, L.-J., Li, Q., Xiao, L.-T., Sun, T., Li, J., Deng, X.-W., Lee, C. M., Thomashow, M. F., Yang, Y., He, Z., & He, S. Y. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1201616109>
- Yang, G., Ishimaru, Y., Hoshino, S., Muraoka, Y., Uozumi, N., & Ueda, M. (2022). 12-Hydroxyjasmonic acid glucoside causes leaf-folding of *Samanea saman* through ROS accumulation. *Scientific Reports*, 12(1), 7232. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11414-2>
- Yang, L., Liu, P., Wang, X., Jia, A., Ren, D., Tang, Y., Tang, Y., Deng, X. W., & He, G. (2021). A central circadian oscillator confers defense heterosis in hybrids without growth vigor costs. *Nature Communications*, 12(1), 2317. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22268-z>
- Yassin, M., Ton, J., Rolfe, S. A., Valentine, T. A., Crome, M., Holden, N., & Newton, A. C. (2021). The rise, fall and resurrection of chemical-induced resistance agents. *Pest Management Science*, 77(9), 3900–3909. <https://doi.org/10.1002/ps.6370>
- Yoneyama, K., & Bennett, T. (2023). Whispers in the dark: Signals regulating underground plant–plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 102456. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2023.102456>
- Youssef, A., Laizet, Y., Block, M. A., Maréchal, E., Alcaraz, J.-P., Larson, T. R., Pontier, D., Gaffé, J., & Kuntz, M. (2010). Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *The Plant Journal*, 61(3), 436–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2009.04067.x>
- Zarei, A., Körbes, A. P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., & Memelink, J. (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 75(4–5), 321–331. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9728-y>
- Zhai, L., Li, H., Song, S., Zhai, L., Ming, B., Li, S., Xie, R., Jia, X., & Zhang, L. (2021). Intra-specific competition affects the density tolerance and grain yield of maize hybrids. *Agronomy Journal*, 113(1), 224–235. <https://doi.org/10.1002/agj2.20438>
- Zhai, Q., Zhang, X., Wu, F., Feng, H., Deng, L., Xu, L., Zhang, M., Wang, Q., & Li, C. (2015). Transcriptional Mechanism of Jasmonate Receptor COI1-Mediated Delay of Flowering Time in Arabidopsis. *The Plant Cell*, tpc.15.00619. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00619>
- Zhang, M., Li, W., Zhang, T., Liu, Y., & Liu, L. (2024). Botrytis cinerea-induced F-box protein 1 enhances disease resistance by inhibiting JAO/JOX-mediated jasmonic acid catabolism in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 17(2), 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.12.020>
- Zhang, T., Poudel, A. N., Jewell, J. B., Kitaoka, N., Staswick, P., Matsuura, H., & Koo, A. J. (2016). Hormone crosstalk in wound stress response: Wound-inducible amidohydrolases can simultaneously regulate

- jasmonate and auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67(7), 2107–2120. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv521>
- Zhang, W., Corwin, J. A., Copeland, D., Feusier, J., Eshbaugh, R., Chen, F., Atwell, S., & Kliebenstein, D. J. (2017). Plastic Transcriptomes Stabilize Immunity to Pathogen Diversity: The Jasmonic Acid and Salicylic Acid Networks within the *Arabidopsis/ Botrytis* Pathosystem. *The Plant Cell*, 29(11), 2727–2752. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00348>
- Zhang, Y., & Turner, J. G. (2008). Wound-Induced Endogenous Jasmonates Stunt Plant Growth by Inhibiting Mitosis. *PLoS ONE*, 3(11), e3699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003699>
- Zheng, X., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., He, S. Y., & Dong, X. (2012). Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host & Microbe*, 11(6), 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.04.014>
- Zhu, T., Herrfurth, C., Xin, M., Savchenko, T., Feussner, I., Goossens, A., & De Smet, I. (2021). Warm temperature triggers JOX and ST2A-mediated jasmonate catabolism to promote plant growth. *Nature Communications*, 12(1), 4804. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24883-2>
- Züst, T., & Agrawal, A. A. (2017). Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 513–534. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040856>
- Züst, T., Joseph, B., Shimizu, K. K., Kliebenstein, D. J., & Turnbull, L. A. (2011). Using knockout mutants to reveal the growth costs of defensive traits. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1718), 2598–2603. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2475>