



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



## Trabajo Final de Máster

# Estudio de la función de Twi1 y THT en la respuesta a herida en plantas de tomate

Curso **2020-2021**

Realizado por:

**Lucía Martín Román**

Directoras:

**María Purificación Lisón Párraga**

**María Pilar López Gresa**

Valencia, enero 2021





## Resumen

Los metabolitos secundarios juegan un papel muy importante en la defensa de las plantas. Estos compuestos sintetizados por las plantas incluyen terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos provienen de la ruta del shikimato e incluyen a los fenilpropanoides, compuestos que participan en la respuesta defensiva de plantas frente a patógenos e insectos. Los ácidos hidroxicinámicos (HCA) y los flavonoides son dos tipos de fenilpropanoides que resultan importantes para este trabajo.

Se ha descrito que plantas transgénicas de tomate que sobre-expresan el enzima tiramina hidroxicinamoil transferasa (*35::THT*), que participa en la ruta de biosíntesis de amidas del ácido hidroxicinámico (HCAAs), son más resistentes a la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Campos et al., 2014). Las HCAAs, derivadas de los HCA, tienen un papel importante en la defensa de la planta, al igual que los flavonoides. La mayoría de los flavonoides en plantas superiores se pueden acumular en forma de glicoconjugados. La glicosilación es una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios y se lleva a cabo mediante unas enzimas denominadas glicosiltransferasas. Se ha demostrado que la glicosiltransferasa de tomate inducida por herida, *Twil* (Tomato Wound Induced 1) muestra actividad *in vitro* frente a los flavonoides quercetina y kaempferol. Asimismo, plantas transgénicas de tomate que tienen silenciada esta glicosiltransferasa (*RNAi\_Twil*) presentan una acumulación diferencial de sustratos y una mayor susceptibilidad al virus del bronceado del tomate (Campos et al., 2019).

Puesto que tanto *THT* como *Twil* se inducen en plantas de tomate en respuesta a herida, en este Trabajo fin de Máster se estudia el papel que ambos genes, y sus correspondientes metabolitos asociados, pueden jugar en la respuesta de las plantas de tomate a este tipo de estrés. Para ello, se han llevado a cabo metodologías de caracterización fenotípica, molecular y química de las plantas transgénicas de tomate *35::THT* y *RNAi\_Twil* en respuesta a la herida. Con los resultados obtenidos, se sugiere que las plantas *35S::THT* activan en menor medida la respuesta defensiva tras herir, ya que podrían ser más resistentes al daño mecánico mediante el refuerzo de la pared celular por parte de las HCAAs. Por otro lado, las plantas de tomate *RNAi\_Twil* presentan una mayor inducción de genes en respuesta a herida, sugiriendo que la glicosilación de los sustratos de *Twil*, como la quercetina, podría reprimir esta respuesta. El estudio de los niveles de acumulación de quercetina sugiere que la herida produce una disminución de los niveles de quercetina libre y total en plantas de tomate, mientras que el silenciamiento de *Twil* produce su aumento.

Nuestros resultados parecen indicar que los genes *THT* y *Twil*, que participan en el metabolismo de las HCAAs y los flavonoides, respectivamente, parecen jugar un papel en la respuesta defensiva a la herida.



## Abstract

Secondary metabolites play a very important role in the defense of plants. These compounds synthesized by plants include terpenes, alkaloids and phenolic compounds. Phenolic compounds come from the shikimate pathway and include phenylpropanoids, compounds that participate in the defensive response of plants against pathogens and insects. Hydroxycinnamic acids (HCA) and flavonoids are two types of phenylpropanoids important for this work.

It has been described that transgenic tomato plants overexpressing the enzyme tyramine hydroxycinnamoyl transferase (*35::THT*), which participates in the hydroxycinnamic acid amide biosynthesis pathway (HCAAs), are more resistant to the bacterium *Pseudomonas syringae pv* tomato (Campos et al., 2014). HCAAs, derived from HCAs, and flavonoids play an important role in plant defense. Most of the flavonoids in higher plants can be accumulated as glycoconjugates. Glycosylation is one of the most common modifications of secondary metabolites and is carried out by enzymes called glycosyltransferases. It has been shown that the wound induced tomato glycosyltransferase, *Twil* (Tomato Wound Induced 1) shows *in vitro* activity against the flavonoids quercetin and kaempferol. Also, transgenic tomato plants silencing this glycosyltransferase (*RNAi\_Twil*) show differential accumulation of substrates, and increased susceptibility to tomato wilt virus (Campos et al., 2019).

Since both *THT* and *Twil* are induced in tomato plants in response to injury, this work studies the role that both genes, and their corresponding associated metabolites, can play in the response of tomato plants in this type of stress. To this aim, phenotypic, molecular and chemical characterizations of *35::THT* and *RNAi\_Twil* tomato transgenic plants in response to injury have been carried out. Our results suggest that *35S::THT* plants activate to a lesser extent the defensive response after wounding, since they could be more resistant to mechanical damage through the reinforcement of the cell wall by HCAAs. On the other hand, *RNAi\_Twil* tomato plants showed a higher induction of genes in response to injury, suggesting that glycosylation of *Twil* substrates, such as quercetin, could suppress this response. The analysis of the quercetin levels appeared to suggest that wounding produces a decrease in the levels of free and total quercetin, while *Twil* silencing produces its increase.

Our results suggest that *THT* and *Twil* genes, which are involved in the metabolism of HCAAs and flavonoids, respectively, seem to play a role in the defensive response to the wounding.



# **Estudio de la función de Twi1 y THT en la respuesta a herida en plantas de tomate.**

Lucía Martín Román

## **ÍNDICE**

### **INTRODUCCIÓN**

<b>1. Importancia agronómica del tomate.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Mecanismos de respuesta defensiva de las plantas.....</b>	<b>2</b>
2.1. Señalización de la respuesta defensiva.....	2
2.2. La respuesta defensiva frente a patógenos.....	3
2.3. La respuesta inducida por herida.....	4
<b>3. Metabolitos secundarios en la respuesta defensiva.....</b>	<b>7</b>
3.1. Los fenilpropanoides: biosíntesis y papel en la respuesta defensiva.....	7
3.2. Los fenilpropanoides en la respuesta a herida.....	9
<b>4. Modificaciones de los metabolitos secundarios.....</b>	<b>10</b>
4.1. Conjugación de ácidos hidroxycinnámicos con aminas biogénicas. THT – Hidroxycinnamoil-transferasa.....	11
4.2. Glicosilación de compuestos fenólicos. Twi1 – Glicosil-transferasa.....	12

### **OBJETIVOS**

### **MATERIALES Y METODOS**

<b>1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....</b>	<b>16</b>
1.1. Esterilización y germinación de las semillas.....	16
1.2. Condiciones de cultivo.....	16
<b>2. Herida y toma de muestra.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Análisis de ácidos nucleicos.....</b>	<b>17</b>
3.1. Extracción de RNA total.....	17
3.2. Retrotranscripción.....	18
3.3. Amplificación cuantitativa de DNA: q-RT-PCR.....	18
<b>4. Análisis de compuestos.....</b>	<b>19</b>
4.1. Análisis de compuestos fenólicos libres y totales.....	19
4.2. Análisis de compuestos fenólicos conjugados.....	20



5. Tinción de callosa con Azul de Anilina en hojas de <i>S.lycopersicum</i> .....	20
6. Análisis estadístico.....	21

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en respuesta a herida.....	22
1.1. Análisis en plantas transgénicas <i>35S::THT 7.3</i> .....	22
1.2. Análisis en plantas transgénicas <i>RNAi_Twi1</i> .....	26
2. Acumulación de quercetina total en plantas de tomate <i>RNAi_Twi1</i> heridas.	29
3. Análisis de callosa en respuesta a herida en plantas <i>RNAi_Twi1</i> y <i>35S::THT</i> .....	31
3.1. Expresión génica de <i>CalS12</i> .....	31
3.2. Tinción de callosa con azul de anilina.....	32

## CONCLUSIONES

## BIBLIOGRAFÍA

## Índice de figuras y tablas.

Figura 1: Modelo de represión transcripcional mediado por JAZ y activación transcripcional de señalización de JA mediado por la percepción de JA-Ile.....	5
Figura 2: Ruta de biosíntesis de ácidos hidroxicinámicos (HCA) como el ácido p-coumárico y el ácido ferúlico.....	8
Figura 3: Modelo de los efectos combinados producidos por estrés por radiación UVB y herida en la acumulación de compuestos fenólicos y ácido ascórbico en tuna roja.....	10
Figura 4: La ruta biosintética del HCAA p-coumaroiltramina .....	11
Figura 5: Mecanismo de reacción en trigo sarraceno catalizado por el enzima flavonol 3-O-glucosiltransferasa F3GT con quercetina y UDP-glucosa como sustratos, para formar isoquercetina (quercetina 3-O-glucósido) la cual utiliza en una reacción posterior el enzima flavonol 3-O-rhamnosiltransferasa para formar rutina (quercetina 3-O-rutinosido) y la posterior liberación de la fracción UPD.....	13
Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la medición de expresión génica mediante la realización de qPCR.....	19
Figura 6: Expresión relativa de los genes <i>Twi1</i> , <i>THT</i> , <i>TCI21</i> , <i>JAZ3</i> , <i>LoxD</i> y <i>PAL</i> en hojas de plantas transgénicas de tomate <i>35S::THT</i> (THT 7.3) y su parental Moneymaker (MM) ) después de 24h de la herida (H) y sin herir (NH).....	24
Figura 7: Expresión relativa de los genes <i>CAT</i> , <i>SOD</i> y <i>POD</i> en hojas de plantas de tomate Moneymaker como control (MM) y <i>35S::THT7</i> (THT7.3) heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH).....	25
Figura 8: Expresión relativa de los genes <i>Twi1</i> , <i>THT</i> , <i>TCI21</i> , <i>JAZ3</i> , <i>LoxD</i> y <i>PAL</i> en hojas de plantas de tomate Money Maker como control (MM) y en transgénicas <i>Twi1</i> 1.1 y <i>Twi1</i> 28.3 heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH).....	27
Figura 9: Expresión relativa de los genes <i>CAT</i> , <i>SOD</i> y <i>POD</i> en hojas de plantas de tomate Money Maker como control (MM) y <i>Twi1</i> 1.1 y <i>Twi1</i> 28.3 heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH).....	28
Figura 10: Niveles de acumulación de quercetina total (suma de quercetina libre y glicosilada) en plantas de tomate Money Maker como control y transgénicas <i>Twi1</i> 1.1.....	30
Figura 11: Niveles de acumulación de quercetina libre en plantas de tomate Money Maker como control y transgénicas <i>Twi1</i> 1.1.....	30
Figura 12: Expresión relativa de CalS12-like en hojas de plantas de tomate Money Maker como control (MM), hojas de plantas <i>Twi1</i> 1.1 y <i>Twi1</i> 28.3 y plantas THT 7.3 heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH).....	32
Figura 13: Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de línea THT 7.3 y su parental.....	33
Figura 14: Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de las líneas <i>Twi1</i> 1.1, <i>Twi1</i> 28.3 y su parental.....	34



## INTRODUCCIÓN

### 1. Importancia agronómica del tomate

La planta de tomate, *Solanum lycopersicum* L., es una herbácea de la familia de las Solanáceas cuyo género es el más amplio, comprendiendo entre 1200 y 1700 especies presentes en casi toda la zona templada y tropical. Es un cultivo hortícola de una gran importancia económica, con una producción mundial superior a 180 millones de toneladas (FAO, 2019). En España se destinan 56.037 hectáreas al cultivo del tomate, con un rendimiento de cinco millones de toneladas, situándose como el octavo mayor país productor de tomate a nivel mundial.

Esta especie se ha extendido a nivel mundial desde la zona de Perú-Ecuador, y fue introducida en Europa en el siglo XVI (Argerich et al., 2013). Aunque la climatología afecta a su desarrollo, *S. lycopersicum* puede cultivarse en cualquier época del año, siendo de primavera a verano la época de máximo potencial de crecimiento, coincidiendo con la presencia de plagas y enfermedades (Meza et al. 2013), producidas por artrópodos, nemátodos, hongos, bacterias y virus con efectos devastadores (Ramegowda y Senthil-Kumar, 2015).

Entre las plagas más importantes del tomate se encuentran los perforadores o succionadores como la mosca blanca *Bemisia tabaci*, los trips del género *Frankliniella*, los ácaros del género *Tetranychus* y los pulgones como *Macrosiphum euphorbiae*. Algunas de estas plagas, además, son vectores de virus. Por otro lado, también se encuentran los insectos masticadores como *Tuta absoluta* (Gallo et al., 2002). Estos artrópodos pueden causar grandes pérdidas en cosechas de tomate, llegando a provocar una reducción de casi el 60% de beneficios del cultivo del tomate (Picanço et al. 2007). De la misma manera pueden sufrir infecciones de nemátodos endoparásitos formadores de nódulos en raíz como son *Meloidogyne sp*, que se consideran una de las plagas más dañinas del tomate a nivel mundial (Trudgill y Blok, 2001).

Por otro lado, son unas 200 especies de microorganismos patógenos de origen fúngico, bacteriano o viral las que infectan *S. lycopersicum*, afectando a la cantidad y calidad de los cultivos (Csizinszky et al., 2005; Reis y Lopes, 2006; Akhtar et al., 2010). Estos microorganismos pueden causar efectos en la planta como marchitamiento, manchas, pudrimiento de raíces, daño a semillas (Anderson et al., 2004), afección de diferentes partes de la planta (Walling, 2008). Además, también actúan como agentes de transmisión a otras plantas sanas (Mann et al., 2012).

La Biotecnología ha permitido el avance en la lucha contra estas plagas y enfermedades del tomate. El presente trabajo pretende profundizar en el estudio de los mecanismos de defensa que tienen lugar en la planta, con el fin de obtener plantas mejoradas que presenten una mayor resistencia frente a estreses bióticos de diversa naturaleza.

## **2. Mecanismos de respuesta defensiva de las plantas**

Las plantas al ser organismos sésiles, han desarrollado, a lo largo de la evolución, formas de protección ante los diversos estreses bióticos (Dangl y Jones, 2001, Dixon, 2001) produciendo la activación de rutas de señalización de las diferentes respuestas defensivas (Dangl y Jones, 2001; Dixon, 2001). De esta manera se pueden inducir respuestas localizadas que reducen el comienzo del desarrollo de la enfermedad en la zona de entrada del patógeno o del insecto y, por otro lado, se activan las respuestas sistémicas que aportan resistencia a otras partes de la planta frente a posibles ataques posteriores (Halim et al. 2006).

Como mecanismo de resistencia, las plantas emplean diferentes estrategias para defenderse de los patógenos y de los insectos. La primera línea defensiva incluye la protección directa con barreras químicas y físicas constitutivas, es decir presentes independientemente del estrés biótico. La segunda se activa con el reconocimiento del patógeno o del insecto y lleva consigo la inducción de una respuesta defensiva específica del tipo de ataque.

### **2.1. Señalización de la respuesta defensiva.**

Las plantas activan rutas de defensa específicas frente a los diferentes tipos de estreses bióticos (Thomma et al., 2001). La señalización de estas rutas defensivas está mediada por moléculas clave en la regulación de la expresión de las proteínas de defensa específicas para cada una de ellas (Uknes et al., 1992; Stuiver et al., 2001). Así pues, compuestos como el SA, el JA y el etileno (ET) regulan las rutas de defensa de las plantas para desencadenar las respuestas apropiadas (Van Loon et al, 2006; Wünsche et al, 2011). Mientras que la ruta señalizada por SA se activa principalmente en respuesta a patógenos biotrófos y conduce a la síntesis de proteínas PR, la ruta mediada por JA/ET se activa frente a patógenos necrotrofos y herida (Zhang et al., 2017) y lleva consigo la acumulación de inhibidores de proteasas (PI) en tomate (Farmer et al, 1990).

Existe una comunicación cruzada entre respuestas de defensa mediadas por SA y JA/ET aunque tienen interacciones opuestas (Dempsey et al., 2017). Así pues, la resistencia a biótrosos está a menudo correlacionada con una mayor susceptibilidad a patógenos necrótrofos, y una resistencia a necrótrofos está con frecuencia correlacionada con una mayor susceptibilidad a patógenos biótrosos (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Amil-Ruiz et al., 2016).

## **2.2.La respuesta defensiva frente a patógenos.**

Los sistemas de resistencia inducida contra patógenos en plantas constan de varios niveles (Jones y Dangl, 2006). En el primero conocido como PTI (PAMP Triggered Immunity), la planta reconoce los patrones moleculares asociados a patógenos o microorganismos (PAMPs). En el segundo, conocido como ETI (Effector-Triggered Immunity), la planta reconoce específicamente a los efectores patogénicos dando lugar a la resistencia a la enfermedad. Se produce la muerte celular alrededor del punto de entrada del patógeno, produciendo un rápido colapso del tejido infectado e impidiendo la posterior expansión del patógeno, conocida como “reacción hipersensible (Hypersensitive Reaction, HR). La función de la HR es entre otras, restringir la expansión del patógeno en la planta mediante un proceso en el que las células situadas alrededor de la respuesta adquieren una resistencia local (Ross, 1961a) de modo que refuerza las paredes celulares, induce la síntesis de fitoalexinas y la expresión de genes relacionados con la defensa frente a patógenos (Hammond-Kosack y Jones, 1997; Fritig et al., 1998). Otra función de la HR es iniciar una liberación de señales móviles que inducen mecanismos de defensa en partes de la planta no infectadas (Hammond-Kosack Jones, 1997) dando lugar a una resistencia sistémica adquirida (SAR) que protege a la planta durante un largo periodo frente a infecciones posteriores de distinta naturaleza (Ryals et al., 1996). Tanto la activación de HR como la de SAR dependen de la acumulación de ácido salicílico (SA), que ha sido considerada como la molécula señal clave de la activación de la respuesta defensiva frente a patógenos (Ding y Ding, 2020).

Las reorganizaciones transcriptómicas (Reymond et al., 2004; Bosch et al., 2014) producidas en tomate, como consecuencia de una infección patogénica aumentan la resistencia de la planta a sus atacantes (Stout et al. 2018). Gran parte de los transcritos que se regulan negativamente están relacionados con el metabolismo primario (Gómez et al., 2010), mientras que, por el contrario, los genes regulados positivamente están relacionados con el metabolismo secundario y con la resistencia de la planta (Chen et al.,

2005; Thaler et al., 2010; Bosch et al., 2014). Entre estos genes defensivos se encuentran las proteínas PRs (Pathogenesis related) que se utilizan como marcadores clásicos de la respuesta defensiva a patógenos en plantas de tomate (Tornero et al., 1993).

### **2.3.La respuesta inducida por herida.**

Tanto factores abióticos (sequía, temperaturas extremas, lluvia, granizo) como bióticos (organismos herbívoros e insectos que se alimentan de plantas, microorganismos infectando tejidos) causan un daño mecánico produciendo una herida en especies vegetales (León et al, 2001; Schilmiller y Howe, 2005; Lup et al 2016). Ante estos agentes estresantes las células vegetales responden mediante la activación de rutas bioquímicas para crear una barrera e iniciar estrategias de cicatrización de las heridas causadas (Green y Ryan, 1972; León et al 1998; Savatin et al, 2014 y Minibayeva et al 2015).

Como en la respuesta a patógenos y debido a las redes de señalización, se inducen cambios no sólo a nivel local, sino también a nivel sistémico. En *S.lycopersicum*, los herbívoros (Gatehouse, 2002), el daño mecánico o herida (Farmer y Ryan, 1990; Howe, 2004) y algunos tipos de patógenos necrotróficos producen una respuesta que genera la activación de la ruta de señalización mediada por la hormona ácido jasmónico (JA; Wasternack et al., 2006), que activa la defensa sistémica (Schilmiller y Howe, 2005). En tomate, el proceso comienza con la producción de sistemina, un péptido de 18 aminoácidos (McGurl y Ryan, 1992; Bergey et al., 1996; Schilmiller y Howe, 2005; Chen et al., 2006). La unión de la sistemina a su receptor quinasa en la membrana plasmática (Scheer y Ryan, 2002) activa una fosfolipasa que libera ácido linoleico, a partir del cual se sintetiza el JA (Bergey et al., 1996; Campos et al., 2014) mediante la acción de las lipoxigenasas (LOX), enzimas oxidantes de lípidos en plantas (Andre y Hou, 1932; Rance et al., 1998; Porta y Rocha-Sosa, 2002). De entre todos los genes que codifican las LOX, *LOXD* es uno de los más expresados tras 30 minutos de haberse producido la herida y está involucrado tanto en la biosíntesis de JA como en funciones de defensa de la planta (Yan et al., 2013).

El compuesto que activa directamente estas respuestas defensivas inducidas por JA es JA-Isoleucina (JA-Ile; Staswick y Tiryaki, 2004; Thines et al., 2007; Katsir et al., 2008b; Melotto et al., 2008) a través de las proteínas JAZ (proteínas de jasmonato con dominio ZIM), las cuales se inducen en respuesta a herida (Koo et al., 2009). En condiciones, normales, cuando los niveles de JA son bajos en las células, JAZ se une a MYC2, reprimiendo la respuesta a JA (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Chico et

al., 2008; Katsir et al., 2008a). Es decir, participan en el mecanismo represor de respuestas transcripcionales dependientes de JA. Sin embargo, cuando aumentan los niveles de JA, su forma activa JA-Ile se une al receptor COI1 (*coronatine insensitive1*) facilitando la degradación de las proteínas represoras JAZ, liberando así MYC2 y activando la respuesta defensiva (Figura 1; Chini et al., 2007; Thines et al., 2007).

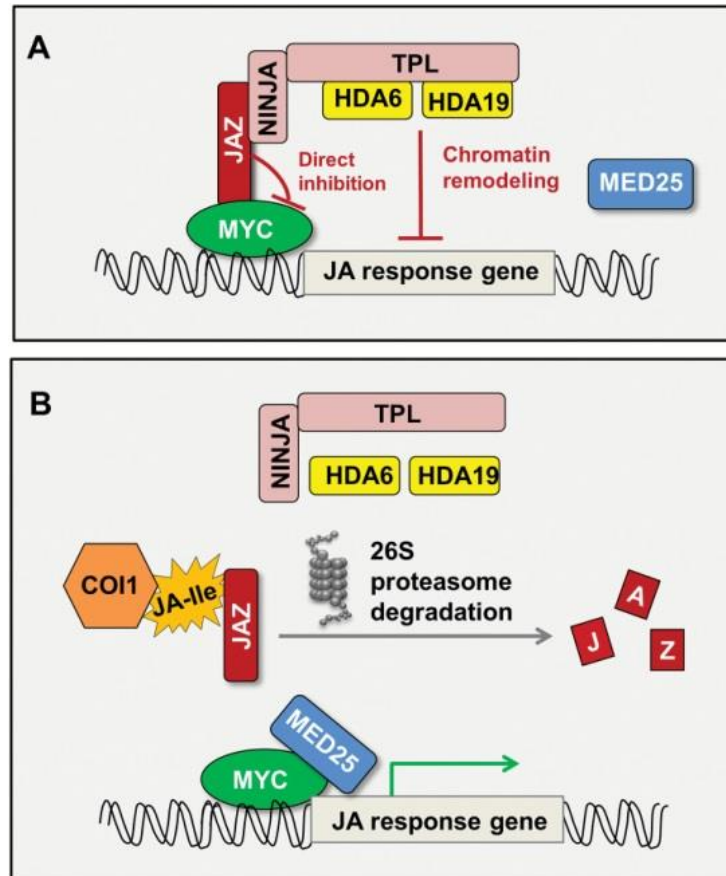


Figura 1: Modelo de represión transcripcional mediado por JAZ y activación transcripcional de señalización de JA mediado por la percepción de JA-Ile. A: En condiciones normales la expresión de genes de respuesta a JA es reprimida por las proteínas de la familia de JAZ, que funcionan como represores transcripcionales (mediante la unión e inhibición de factores de transcripción MYC. Las flechas rojas indican represión transcripcional. B: Ja-Ile activa la interacción de JAZ y COI1, posteriormente forman un complejo (Thines et al., 2007; Katsir et al., 2008; Melotto et al., 2008; Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010) que lleva a la ubiquitinación y a la degradación por el proteasoma de represores JAZ y libera los FT MYC (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). Las flechas verdes indican activación de genes de respuesta a JA. Figura tomada de Zhang L. et al, 2017.

Posteriormente, la activación transcripcional de genes mediada por JA conduce al aumento de la biosíntesis de compuestos secundarios y de inhibidores de proteasas (PI; Donnell et al. 1998), proteínas capaces de inhibir la actividad proteolítica de proteasas digestivas en insectos (Duffey y Stout, 1996) y conferir resistencia (Stout et al. 2018). Es por ello por lo que se utilizan como marcadores de la respuesta a herida (Bowles, 1993). En particular, la proteína inhibidora de quimotripsina en tomate TCI21, constituye un buen marcador de la respuesta a herida en tomate (Lisón et al, 2006). Asimismo, la herida



produce la acumulación de polifenoloxidasas (PPO) (Bergey et al., 1996; Duffey and Stout, 1996), una enzima oxidativa que cataliza la producción de quinonas a partir de difenoles, reduciendo el valor nutritivo de las hojas para herbívoros (Duffey Stout, 1996; Zhang et al., 2008) y afectando por tanto al crecimiento y reproducción de los mismos (Bhonwong et al., 2009).

Tras el estrés por herida, las células vegetales activan el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante un aumento de oxidación de lípidos y proteínas para tratar de evitar infecciones en la zona de la herida (Orozco et al, 2001; Fernández-Ocaña et al 2011; Soares et al, 2011; Beneloujaephajri et al, 2013), causando estrés oxidativo en la zona dañada o bien actuando como moléculas señal (Houmani et al, 2018). Sin embargo, las ROS en altas concentraciones pueden ser tóxicas por lo que las especies vegetales han desarrollado un efectivo mecanismo antioxidante utilizando tanto biometabolitos como enzimas (Foyer y Shigeoka, 2011; Bela et al., 2015). Por ejemplo, las superóxido dismutasas (SOD) proporcionan defensa antioxidante mediante la dismutación de  $O_2^-$  en  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Entre las enzimas que protegen a la célula del daño oxidativo producido por ROS mediante la eliminación del  $H_2O_2$  producido, destacan las catalasas (CAT) que lo descomponen a  $H_2O$  y  $O_2$  (Scandalios et al. 1997) y las peroxidasas (POD), que son oxidoreductasas (Creissen et al. 1994) inducidas tras herida (Francia et al. 2007) que además intervienen en procesos de lignificación, suberificación y polimerización de fenoles (Kolattukudy *et al.* 1992).

La herida, además, induce rápidamente la síntesis de callosa (Stone y Clarke, 1992; Jacobs et al, 2003), un polímero de glucosa con enlaces  $\beta$ -1,3-glucano, que también se deposita en la zona de infección reforzando la pared celular para evitar la penetración de patógenos (Hofmann et al., 2010; Ellinger et al., 2013). En el caso de *Arabidopsis* su genoma codifica 12 enzimas implicadas en la síntesis de la callosa (Richmond and Somerville, 2000; Hong et al., 2001) (CalSs) y es degradada por  $\beta$ -1,3-glucanasas (Chen y Kim, 2009). De las cuales, Cals12 (también llamado GSL5 y PMR4) es la responsable de esta síntesis inducida por patógenos (Nishimura et al., 2003; Clay et al., 2009) y herida (Jacobs et al., 2003). En tomate, se ha descrito que la inducción de *CalS11-like* and *CalS12-like* se reprime tras la infección con viroide (Adkar-Purushothama et al., 2015).

Tanto la respuesta defensiva activada por patógenos como la activada por insectos o herida incluyen la producción de metabolitos secundarios, que son compuestos de bajo peso molecular, que restringen el avance de la agresión (Stout et al. 2018).

### 3. Metabolitos secundarios en la respuesta defensiva.

Las plantas producen una diversa gama de productos naturales conocidos como metabolitos secundarios, que difieren de los componentes del metabolismo primario en que no son esenciales para los procesos metabólicos básicos de la planta (Dixon, 2001). Para gestionar las interacciones con el medioambiente y otras formas de vida, las plantas sintetizan estos metabolitos secundarios que incluyen a tres grupos estructurales: **terpenos, alcaloides y compuestos fenólicos** (Taiz y Zeiger, 1991). Al igual que muchas de las especies de la familia de las Solanaceas, *S. lycopersicum* contiene numerosos compuestos pertenecientes a estos tres grupos (Duffey y Stout, 1996; Glas et al., 2012).

Los **terpenos** son una enorme y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno descritos tanto en plantas, como en animales y microorganismos (Roberts, 2007). Tienen un papel importante en la defensa de las plantas frente estreses bióticos y abióticos. En el caso de Solanáceas, algunos sesquiterpenoides (Harborne, 1999) actúan como fitoalexinas acumulándose en la zona de infección impidiendo la propagación de los patógenos (Jeandet et al., 2013).

Los **alcaloides**, son compuestos nitrogenados básicos naturales de origen vegetal que proceden de los aminoácidos (Culvenor, 1973; Petterson et al, 1991; Waterman, 1993). Son un grupo de metabolitos secundarios implicados en el sistema defensivo químico de las plantas tanto constitutivo como inducible. Tienen múltiples efectos fisiológicos en posibles predadores (Walling, 2008; Creelman y Mullet, 1997) y actividades antibióticas (Oka et al., 2006). En la planta de tomate destaca la tomatina, un glicoalcaloide encontrado en los tallos y hojas con propiedades fungicidas (Oka et al., 2006).

En cuanto a los compuestos **fenólicos** son un grupo de compuestos secundarios que provienen de la ruta del shikimato (Martin, 2018), y tienen al menos un anillo aromático con un grupo hidroxilo en su estructura. Dependiendo de su esqueleto carbonado, estos compuestos se pueden dividir en los fenólicos simples (C6), estilbenos (C6-C2) y fenilpropanoides (C6-C3).

#### 3.1. Los fenilpropanoides: biosíntesis y papel en la respuesta defensiva

Los fenilpropanoides son una familia de compuestos fenólicos que participan en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos e insectos (Newman et al. 2001; Ishihara et al. 2008; Naoumkina et al. 2010; Vogt 2010; Ghasemzadeh et al., 2011). Incluyen a dos grupos de compuestos defensivos muy relevantes en este TFM, los ácidos

hidroxicinámicos y los flavonoides (De la Rosa et al, 2019). Su ruta de biosíntesis se muestra en la figura 2.

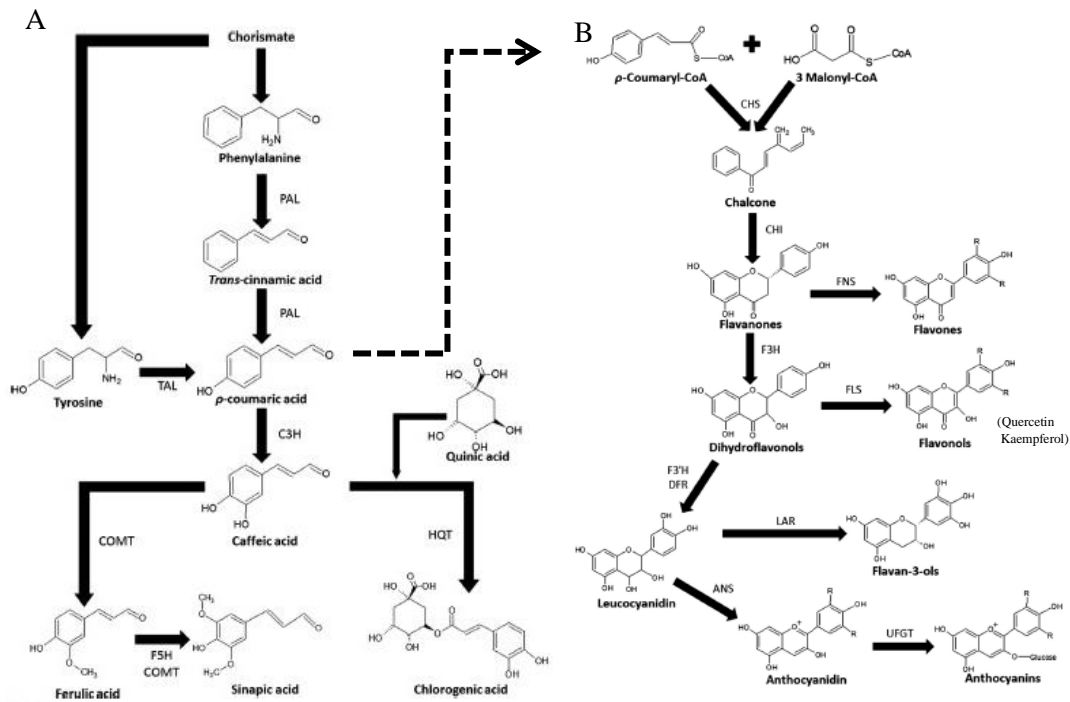


Figura 2. A: Ruta de biosíntesis de ácidos hidroxicinámicos (HCA) como el ácido p-coumarico y el ácido ferúlico. C4H, 4-cinamato hidroxilasa; C3H, 3-coumaril hidroxilasa; COMT, ácido cafeico o-metiltransferasa; F5H, ferulato 5-hidroxilasa; HCQT, Hidroxicinnamoil-coenzima A quinato transferasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; TAL, tirosina amonio liasa. B: Ruta de biosíntesis de flavonoides, donde el flavonol que tiene como radicales OH y H pertenece a la estructura de la quercetina. CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavonona 3-hydroxylase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; FNS, flavona sintasa; FLS, flavonol sintasa; DFR, dihidroflavonol 4-reductasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; ANS, antocianidina sintasa; UFGT, UDP-glucose: flavonoide 3-O-glucosiltransferase. (Adaptado de De la Rosa et al, 2019).

Los ácidos hidroxicinámicos se sintetizan a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina por la acción de la fenilalanina amonio-liasa (PAL) y tirosina amonio-liasa (TAL), respectivamente, que dan lugar al ácido cinámico, precursor de los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico (Figura 2A). La conjugación de estos ácidos con aminas biógenas produce la síntesis de las amidas derivadas de ácidos hidroxicinámicos (HCAA), implicadas en programas de defensa inducibles como componentes finales de la respuesta defensiva de la planta frente a diversos ataques patogénicos (Hahlbrock y Scheel 1989; Keller et al. 1996; Pearce et al. 1998; Schmidt et al. 1998; Newman et al. 2001; Campos et al. 2014).

Los flavonoides existen en la gran mayoría de las especies vegetales y constituyen un grupo muy diverso, tanto biológica como químicamente (Yao et al., 2004). Al igual que

los ácidos hidroxicinámicos, los precursores de los flavonoides proceden del ácido *p*-cumárico (Figura 2B), el cual se activa como *p*-cumaroil-CoA y se condensa con 3 moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona, por la acción del enzima CHS (chalcona sintasa). Después de esta reacción, la CHI (chalcona isomerasa) convierte a la chalcona en una flavanona que es modificada por varios enzimas de la ruta de los flavonoides para generar una amplia diversidad de derivados, entre los que se encuentran los flavonoles como la quercetina y el kaempferol (Figura 2B). La propiedad más destacable de las distintas clases de flavonoides es su elevada capacidad antioxidante (Nijvelt et al., 2001), lo que les permite estabilizar radicales libres que, de otro modo, causarían importantes daños a nivel celular. (Treutter, 2006).

### **3.2. Los fenilpropanoides en la respuesta a herida.**

El estrés provocado por herida en especies vegetales conlleva la producción y acumulación de estos compuestos fenólicos a nivel local y sistémico a través de la producción de ROS y de las rutas de señalización mediadas por ET y JA (Maffei et al, 2007; Engelberth et al, 2012; Koo et al, 2009; Ibáñez et al, 2019). La activación de la producción de estos compuestos se produce debido a la inducción de genes que codifican enzimas relacionadas con su biosíntesis como la PAL y la CHS (Figura 2). Así, se ha demostrado que estos cambios producen aumentos en niveles de flavonoides tales como quercetina y rutina en fresas cuyas hojas han sido heridas (Ibáñez et al, 2019). Del mismo modo, en zanahoria se ha descrito la activación de estos genes tras la herida, acompañada de una acumulación de compuestos fenólicos tales como el ácido clorogénico o el *p*-coumárico (Jacobo-Velazquez et al, 2011; Viacava et al, 2020; Heredia y Cisneros-Zevallos, 2009). La *MpPAL* de *Marchantia polymorpha* también se induce tras la herida, llevando consigo la acumulación de compuestos fenólicos tales como la luteolina, apigenina, y la isoriccardina C (Yoshikawa et al., 2018) y tratamientos exógenos con JA producen la acumulación de flavonoides en cártamo (Tu et al, 2016). En tuna roja sometida a un estrés por herida y radiación UV-B, además de la inducción de PAL y la consiguiente acumulación de compuestos fenólicos como quercetina y kaempferol se observó un aumento de la actividad de la lactona deshidrogenasa (GalLDH) y la biosíntesis del ácido ascórbico (Ortega-Hernández et.al, 2019). Los resultados permitieron generar un modelo fisiológico que explica la acumulación de compuestos fenólicos y de ácido ascórbico en las tunas sometidas a heridas y radiación UV-B, donde

las heridas facilitan que los rayos UV-B accedan al tejido subyacente y mejoran la respuesta defensiva de forma sinérgica (Figura 3).

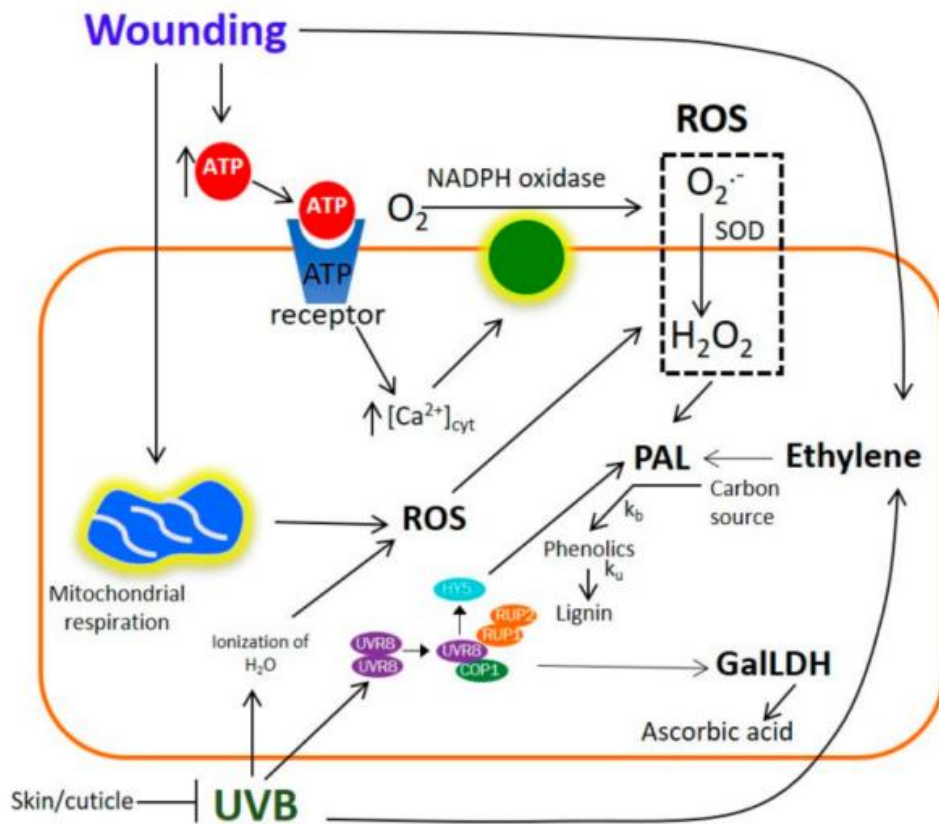


Figura 3: Modelo de los efectos combinados producidos por estrés por radiación UVB y herida en la acumulación de compuestos fenólicos y ácido ascórbico en tuna roja. Cuando se produce herida se facilita la entrada de UV lo que incrementa la activación de factores de transcripción inducidos por ROS y UVB. Para la acumulación de compuestos fenólicos en el tejido herido, el ATP extracelular liberado del tejido herido actúa como señal primaria para la producción de ROS, lo que hace de señal secundaria aumentando los niveles de PAL y compuestos fenólicos.

Además de la activación de los genes implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos, la herida también induce la expresión de los factores de transcripción *RrMYB5* y *RrMYB10* involucrados en la síntesis de proantocianidinas en flores y hojas de *R. rugosa* (Shen et al, 2019).

No obstante, se conoce muy poco acerca de la activación del metabolismo secundario en respuesta a herida en plantas de tomate.

#### 4. Modificaciones de los metabolitos secundarios

A la gran variedad de rutas metabólicas implicadas en la síntesis de compuestos pertenecientes al metabolismo secundario de las plantas, se unen modificaciones adicionales tales como la conjugación, hidroxilación, metilación o acilación que confieren

una mayor diversidad a este grupo de metabolitos (Gachon *et al.*, 2005; D'auria *et al.* 2005).

#### 4.1. Conjugación de ácidos hidroxicinámicos con aminas biogénicas. THT – Hidroxicinnamoil-transferasa.

En plantas superiores, los ácidos hidroxicinámicos como el p-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico; Figura 2A) y el ferúlico (4-hidroxi-3-metoxicinámico; Figura 2A) pueden conjugarse con varias β-feniletilaminas como tiramina y octopamina, formando las amidas derivadas del ácido N-hidroxicinámico (HCAA) que se acumulan mayormente en la pared celular (Strack 1997; Facchini *et al.* 2002). Las HCAAs son los constituyentes fenólicos principales de flores, granos de polen y semillas (Bottcher *et al.* 2008; Luo *et al.* 2009; Handrick *et al.* 2010). Además, poseen un alto poder antioxidante y terapéutico (Zhang *et al.* 1997; Kawashima *et al.* 1998; Nagatsu *et al.* 2000; Park and Schoene 2002; Roh *et al.* 2004) y representan una clase importante de compuestos bioactivos con propiedades antivirales, antibacterianas, antifúngicas e insecticidas (Grandmaison *et al.* 1993; Lee *et al.* 2004; Tebayashi *et al.* 2007).

La enzima tiramina hidroxicinnamoil transferasa THT (Figura 4) cataliza el último paso de la biosíntesis de HCAAs (Negrel y Martin 1984; Negrel y Javelle 1997; Schmidt *et al.* 1999; Facchini *et al.* 2002; von Roepenack *et al.*, 2003). Se aisló por primera vez a partir de la planta de tabaco (Negrel y Martin 1984) y tiene un papel en las respuestas defensivas, ya que se induce por elicitores, herida y patógenos (Hahlbrock y Scheel 1989; Villegas y Brodelius 1990; Negrel *et al.* 1993; Schmidt *et al.* 1998).

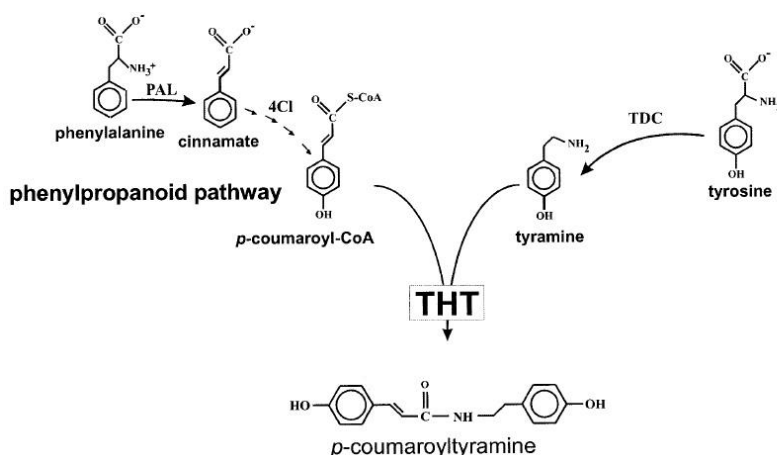


Figura 4 La ruta biosintética del HCAA p-coumaroiltiramina. La enzima THT es responsable de la síntesis de HCAA como p-coumaroiltiramina a partir de tiramina y p-coumaroil-CoA. También las enzimas PAL y 4CL de la ruta de fenilpropanoides, están involucradas en la síntesis del p-coumaroil-CoA del mismo modo que TDC interviene en la síntesis de tiramina (Von Roepenack *et al.* 2003).

En nuestro laboratorio se observó que la infección de plantas de tomate con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* produce la inducción de *THT* y la acumulación de HCAA (Zacarés et al., 2007; López Gresa et al. 2011). Asimismo, se generaron plantas transgénicas de tomate de la variedad Money Maker que sobreexpresan el gen *THT* empleando el promotor constitutivo 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Estas plantas mostraron una mayor acumulación constitutiva de coumaroiltramina (CT) y feruloiltiramina (FT) tanto en hojas como en flores y frutos. Asimismo, la infección de estas plantas transgénicas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* produjo una mayor acumulación no sólo de CT y FT, sino también de las amidas derivadas de la octopamina y de la noradrenalina. Dicha acumulación fue acompañada de una mayor síntesis de SA, mayor inducción de genes PR y una consiguiente mayor resistencia frente a la bacteria (Campos et al. 2014)

La acumulación de HCAA juega un doble papel en la defensa de la planta. Por una parte, actúan físicamente reforzando la pared celular y haciéndola más resistente (Clarke 1982; Negrel y Lherminier 1987) y, por otra, químicamente como agentes antimicrobianos (Newman et al. 2001; Harris et al. 2010). De hecho, la potente actividad antioxidante de la HCAA feruloil-noradrenalina *in vitro* e *in vivo* permitió la solicitud de la patente de este compuesto identificado y caracterizado por nuestro grupo (López-Gresa, et al, 2010).

#### **4.2.Glicosilación de compuestos fenólicos. Twi1–Tomato Wound-induced**

##### **Glicosil-transferasa**

Una de las modificaciones más relevantes en los metabolitos secundarios es la glicosilación (Botella et al. 2016), en la que se produce la adición covalente de azúcares desde el nucleótido donante activado a grupos funcionales (Figura 5), mayormente grupos carboxilo hidroxilo o amino a moléculas aceptoras (Bowles et al, 2005; Gachon et al. 2005; Meech et al. 2020). La glicosilación de los metabolitos reduce su toxicidad, aumenta su solubilidad y acumulación, regula su localización subcelular y su poder antioxidante, entre otras actividades biológicas (Bowles et al, 2005).

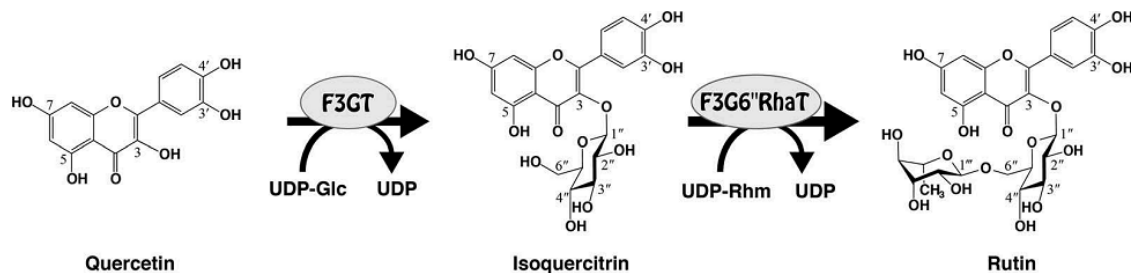


Figura 5 Mecanismo de reacción en trigo sarraceno catalizado por el enzima flavonol 3-O-glucosiltransferasa F3GT con quercetina y UDP-glucosa como sustratos, para formar isoquercetina (quercetina 3-O-glucósido) la cual utiliza en una reacción posterior el enzima flavonol 3-O-rhamnosiltransferasa para formar rutina (quercetina 3-O-rutinosido) y la posterior liberación de la fracción UPD. Modelo de Koja et al 2018.

Este proceso es catalizado por enzimas denominadas uridine diphosphate (UDP) glicosiltransferasas (UGT; Ross et al. 2001; Paquette et al. 2003; Gachon et al. 2005), que son una familia de enzimas presentes en animales, hongos, bacterias y plantas (Meech et al. 2020). Actualmente existen 111 familias de glicosiltransferasas según la base de datos de “Carbohydrate Active enZymes” (CAZy). Las UGTs pertenecen a la familia 1, se localizan generalmente en el citosol y reconocen como sustratos a compuestos de bajo peso molecular como, por ejemplo, compuestos fenólicos, terpenoides, esteroides, y fitohormonas (Ross y O'Neill, 2001; Lim et al, 2005; Bowles et al, 2006; von Saint Paul et al, 2011; Meech et al. 2020). En *Solanum lycopersicum*, esta familia tiene 86 genes del tipo UGT registrados según la base de datos de Uniprot

Las glicosiltransferasas se asocian a la activación de respuestas a diferentes tipos de estreses de las plantas, incluyendo respuestas defensivas (Vogt and Jones, 2000; Dixon, 2001; Qi et al., 2005) y la síntesis de la pared celular (Lao et al., 2003; Egelund et al., 2004). Tal es el caso de la glicosiltransferasa *Twil* de *S. lycopersicum*, que se induce tras herir las hojas, tras la aplicación de SA exógeno (Donnell et al. 1998), y en respuesta a tratamientos con elicitores fúngicos (O'Donnel et al 1998). Este gen comienza a inducirse 15 minutos tras realizarse la herida, hasta 2 horas después, alcanzando un máximo de inducción a las 4 horas después de la herida.

En nuestro laboratorio se generaron plantas transgénicas de tomate de la variedad Money Maker con el gen *Twil* silenciado mediante RNAi resultando más susceptibles a infecciones virales que su fondo genético. Es por ello por lo que se asocia su expresión a una respuesta de defensa. Mediante estudios bioquímicos *in vitro* e *in vivo*, se comprobó que se trata de una glicosiltransferasa que utiliza glucosa UDP como donante de azúcar y como aceptores de azúcar los compuestos fenólicos simples 2,4-DHBA, 2,4,6-THBA, las



cumarinas escopoletina, esculetina y umbeliferona y los flavonoides quercetina y kaempferol (Campos et al., 2019).

Así pues, en nuestro laboratorio disponemos de plantas transgénicas que sobre-expresan el gen *THT* (*35S::THT*) o que silencian el gen *Twil* (*RNAi\_Twil*) que presentan niveles alterados de HCAAs y flavonoides, respectivamente.

## **OBJETIVOS.**

En este trabajo, se pretende estudiar la implicación de los genes *THT* y *Twil* en la respuesta a herida, empleando las plantas transgénicas previamente generadas en nuestro laboratorio, que sobre-expresan el gen *THT* o que silencian el gen *Twil* y que presentan niveles alterados de diferentes compuestos fenólicos.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- I.** Análisis de la inducción de genes implicados en la respuesta a herida en las líneas transgénicas de tomate *Twil* 1.1, *Twil* 28.3, *THT* 7.3 y sus respectivos parentales.
- II.** Estudio de la acumulación en respuesta a herida de quercetina, principal sustrato de *Twil*, en las plantas transgénicas *Twil* 1.1 y su parental Money Maker.
- III.** Estudio de la deposición de callosa en respuesta a herida en las líneas transgénicas de tomate *Twil* 1.1, *Twil* 28.3, *THT* 7.3 y sus respectivos parentales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Material vegetal y condiciones de cultivo**

Para la realización de este Trabajo de Fin de Máster se utilizaron semillas de plantas de tomate *S. lycopersicum* de dos líneas transgénicas *RNAi\_twiI* (Twi1 1.1 y Twi1 28.3), las cuales tienen silenciada la expresión del gen *TwiI* (Campos et al. 2019), de la línea transgénica *35S::THT 7.3* que sobre-expresa el gen *THT* (Campos *et al.*, 2014), así como de sus correspondientes parentales Money Maker.

#### **1.1. Esterilización y germinación de las semillas**

La germinación de las semillas se llevó a cabo mediante técnicas de cultivo *in vitro* en condiciones de total esterilidad. Fueron envueltas en una tela de muselina o Micracloth para la realización posterior de lavados en 4 botes de vidrio esterilizados. El primero de estos recipientes contenía una dilución 1:1 de lejía comercial y agua destilada, con 0,05% (v/v) de Tween-20 para romper la tensión superficial del líquido. Las semillas permanecieron en el primer recipiente durante 30 minutos en agitación leve. Transcurrido este tiempo se realizaron lavados sucesivos de 5, 10 y 15 minutos en botes con agua destilada esterilizada. De esta manera se eliminan los restos de lejía y se favorece la germinación de las semillas.

Tras la realización de los lavados, las semillas de cada variedad se colocaron en una Placa de Petri de 15 cm de diámetro en la cual se introdujo una lámina de papel esterilizado en autoclave para mantener la humedad, se colocaron las semillas separadas sobre el papel y se añadieron 14 mL de agua destilada y esterilizada. Las placas fueron selladas con Micropore™ y envueltas con papel de aluminio para iniciar su germinación en oscuridad durante 2 días a 24°C. Transcurridos los dos días el papel de aluminio fue retirado y las semillas fueron expuestas a luz 16 horas diarias, durante 4 días, en cámara de crecimiento a 24°C con el fin de conseguir su germinación.

#### **1.2. Condiciones de cultivo**

En el momento en el que las semillas germinaron se procedió a su cultivo en invernadero. Para ello se sembró una semilla por cada maceta de 12 cm de alto por 13 cm de diámetro, con turba y perlita a partes iguales y se cultivaron en condiciones de invernadero a temperatura de 18-25°C, a una humedad relativa de 50%-70% y un fotoperiodo de 8 horas de oscuridad y 16 horas de luz y fueron regadas con solución Hoagland (Naranjo et al. 2003).

## **2. Herida y toma de muestra**

Tras 4 semanas de crecimiento de las plántulas, se realizaron 5 heridas en la nervadura de los 5 foliolos de la tercera y cuarta hoja con la ayuda de unas pinzas dentadas que dañan la cara abaxial y adaxial de la hoja. Los mismos foliolos de plantas sin herir fueron tomados como muestras control.

La recogida de muestra se realizó 24 y 48 horas después de herir. Los 5 foliolos heridos fueron recogidos en botes y sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente se guardaron en cámaras de -80°C hasta su análisis. El material vegetal se homogeneizó en condiciones de frío con un molino mezclador MM400 Retsch™.

Para la preparación del material vegetal destinado a microscopía se emplearon los 5 foliolos sometidos a herida de la tercera y cuarta hoja más jóvenes de plantas de 2 meses. Éstos se introdujeron en tubos Falcon® con tampón FAE (50% etanol absoluto, 5% ácido acético glacial y 3,7% formaldehído y agua milliQ hasta llegar al 100%) hasta su posterior tratamiento de fijación.

## **3. Análisis de ácidos nucleicos**

### **3.1. Extracción de RNA total**

Se tomaron 100 mg de cada muestra homogeneizada, en un tubo Eppendorf® de 1,5 mL, se añadió 1 mL de Extrazol para aislar el RNA total, siguiendo las recomendaciones del fabricante para evitar su degradación y se agitaron con vórtex el fin de favorecer al máximo su extracción. Tras 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 µL de cloroformo, se agitaron, se dejaron reposar 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm y 4°C. La fase acuosa se traspasó a un Eppendorf® que contenía 500 µL de isopropanol para precipitar el RNA. Se agitaron y tras 5 minutos a temperatura ambiente se centrifugaron de nuevo 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 75% preparado con agua DEPC (dicarbonato de dietilo; para inactivar enzimas RNAsas). Nuevamente las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 7.000 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se en 90 µL de agua DEPC. Posteriormente se añadieron 10 µL de acetato de sodio (AcNa) 3M y 250 µL de etanol absoluto y se dejaron reposar 1 hora a -80°C para favorecer la precipitación del RNA. Trascorrido este tiempo, se realizó una centrifugación durante 15 minutos a 13.000 rpm y 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado resultante se secó a temperatura ambiente. Finalmente, se

resuspendió el precipitado en 46  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, se calentaron las muestras 5 minutos a 65°C, se centrifugaron 10 minutos a 10.000 rpm y 4°C y se recuperó el sobrenadante (44  $\mu\text{L}$ ).

Para eliminar contaminaciones de DNA se utilizaron enzimas de DNAsa de un Kit comercial Invitrogen TURBO DNA free Kit de Thermo Fisher Scientific. Por cada 44  $\mu\text{L}$  de muestra se requirieron 5  $\mu\text{L}$  de tampón TURBO DNAsa 10x y 1  $\mu\text{L}$  de enzima TURBO DNAsa. Posteriormente se incubaron las muestras a 37°C en un Termobloque Accublock Digital Dry Bath de Labnet International durante -30 minutos, y se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de inactivador del enzima DNAsa y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron durante 2 minutos a 10.000 rpm y 4°C y se transfirió el sobrenadante a un Eppendorf® nuevo para su cuantificación mediante un espectrofotómetro de ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000.

### **3.2. Retrotranscripción.**

Para el análisis de expresión génica por qPCR hay que convertir el mRNA a cDNA, y para ello se lleva a cabo la retrotranscripción, que consiste en añadir a un nuevo Eppendorf® 1  $\mu\text{g}$  de mRNA, 2  $\mu\text{L}$  de tampón, 0,5  $\mu\text{L}$  de oligo dT primer 50  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  de enzima RT y agua DEPC hasta completar un volumen de 10  $\mu\text{L}$ . Tras obtener estos 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla, las muestras se incubaron durante 15 minutos a 37°C en termobloque para realizar la transcripción reversa. Posteriormente, para inactivar la enzima retrotranscriptasa las muestras se incubaron a 85°C en termobloque unos segundos. Finalmente se diluyó el cDNA obtenido de cada muestra a 1:10 con agua DEPC y se almacenó a -20°C en una cámara de frío.

### **3.3. Amplificación cuantitativa de DNA: q-RT-PCR**

Se realizaron PCR cuantitativas para medir la expresión de distintos genes de plantas de tomate implicados en la respuesta herida. Para ello se utilizó un marcador de fluorocromo de PCR PYRO Taq EvaGreen qPCR mix Plus y la reacción se llevó a cabo en un volumen de 10  $\mu\text{L}$  en una placa de 96 pocillos *MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate* (Applied Biosystems). Se utilizó actina como gen endógeno y se realizaron 3 réplicas técnicas de cada una de las muestras biológicas, introduciendo en cada pocillo.

La amplificación de DNA fue controlada a tiempo real mediante el Sistema 7500 Fast Real Time PCR Products (Life Technologies) y Quant studio™ Design & Analysis. Los softwares utilizados para analizar los resultados fueron la versión 2.0.4 del primero y la

versión 1.5.1 del segundo. Se utilizaron diferentes oligonucleótidos para la realización de las distintas qPCRs y en la tabla 1 se encuentran sus correspondientes secuencias.

Tabla 1 Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la medición de expresión génica mediante la realización de qPCR.

<b>Gen</b>	<b>Cebador directo (Forward) 5'&gt;3'</b>	<b>Cebador reverso (Reverse)</b>
<i>Actina</i>	CTA GGC TGG GTT CGC AGG AGA TGA TGC	GTC TTT TTG ACC CAT ACC CAC CAT CAC AC
<i>Twil</i>	GGA TGC GAA GAG CTA TGG AG	CGG ACC AAT AGC CCA ATT TT
<i>THT</i>	CCC CTT TTG ACG AAC CTA AA	TTT GGA TCG GAA TTC CTC AA
<i>TCI21</i>	ACT CGT CCT GTG CTT TGT CC	CCC AAG AGG ATT TTC GTT GA
<i>JAZ3</i>	TTC CCT GCT GAC AAA GCT AGA GCA	AGG GTG CAG ATG AAA CTG ATC CGA
<i>LoxD</i>	GGC TTG CTT TAC TCC TGG TC	AAA TCA AAG CGC CAG TTC TT
<i>PAL</i>	GCC AAG CTA TCG ACT TGA GG	ATT AGC ACC CAT TGC CAG AG
<i>CalS12</i>	AAT GCA TTC GGA TTT TCA GG	TCT GTG TCA TCC CTT GCT TG
<i>CAT</i>	CAA GTT CGC CAT GCT GAG GTG TA	AGC CTG AGA CCA GTA TGT GAT CCA A
<i>SOD</i>	CTT CAC CAC AAC CAG CAC TAC CA	TCC AGG AGC AAG TCC AGT TAT ACG A
<i>POD</i>	TTG GAG TGT CTC GTT GCT C	TTC ACC AGC ACT CCC TGT

#### 4. Análisis de compuestos fenólicos

##### 4.1. Análisis de compuestos fenólicos libres y totales

Se pesaron 500 mg de las muestras homogeneizadas congeladas a -80°C en condiciones de frío, en Eppendorfs® de 1,5 mL. Posteriormente se añadió 1 mL de metanol con o-anísico 0.25mM como patrón interno, y se sometieron a ultra-sonidos durante 10 minutos para favorecer al máximo su extracción. Posteriormente, se centrifugaron a 4°C durante 15 minutos a 12.000 rpm y el sobrenadante se trasvasó a un vial de vidrio. Con el fin de aumentar el rendimiento de la extracción, se repitió el proceso añadiendo 0,5 mL de metanol con el patrón interno y se añadió el sobrenadante al vial. El contenido del vial se dividió en dos partes iguales, en dos viales diferentes para el análisis de los compuestos libres y totales, respectivamente y se llevaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno en un termobloque a 37°C. Una vez desecadas las muestras fueron resuspendidas, por un lado, con 100 µL de enzima β-glucosidasa para liberar los

compuestos fenólicos conjugados en forma de  $\beta$ -glucósidos, en 900  $\mu$ L de acetato de sodio 0,1 M a pH 4,5 obteniendo así los fenólicos totales y, por otro lado, los libres fueron resuspendidos en 1 mL de acetato de sodio 0,1 M a pH 4,5. Estas muestras se dejan a 37°C en un termobloque durante toda la noche.

Pasado este tiempo, se añadieron a todos los viales 77  $\mu$ L de ácido perclórico al 70% con el fin de detener la reacción y se añadieron a cada vial 2,5 mL de ciclopentano-acetato de etilo (50:50), para la extracción de los compuestos fenólicos. Se agitaron las muestras y se dejaron reposar con el fin de que se formaran dos fases. Una vez establecidas, se transfirió la fase superior a un nuevo vial y se evaporó en corriente de nitrógeno. Finalmente, las muestras se resuspendieron las 200  $\mu$ L de metanol con la ayuda de un agitador de vórtex, se filtraron con filtros previamente saturados en metanol y se inyectaron 20  $\mu$ L en el HPLC-MS.

#### **4.2. Análisis de compuestos fenólicos conjugados**

Se pesaron 500 mg de cada muestra en condiciones de frío en Eppendorfs® de 1,5 mL y se procedió a su liofilización. Las muestras se extrajeron con metanol y se realizó un análisis metabolómico no dirigido de metabolitos secundarios empleando un UPLC-QToF-MS/MS en el servicio de metabolómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (Murcia). Los resultados obtenidos están pendientes de ser recibidos.

#### **5. Tinción de callosa con Azul de Anilina en hojas de *S.lycopersicum*.**

La deposición de callosa de las células vegetales se identificó mediante una tinción con azul de anilina (Currier 1957, Hood & Shew 1996, An *et al.* 2010, Chen & Halterman 2011). Está demostrada la unión del fluorocromo del tinte a glucanos y otros polisacáridos vegetales dando lugar a una afinidad entre el pigmento azul de la anilina con los  $\beta$ -1,3-D-glucano, es decir con la callosa, permitiendo realizar estudios sobre respuestas a patógenos (Nowicki *et al.*, 2013).

El tejido vegetal conservado en tampón FAE, fue fijado someténdolo a vacío con la ayuda de una bomba de vacío durante 10 minutos. Posteriormente se eliminó el FAE en exceso, se añadió etanol 70% y se guardaron las muestras a 4°C durante 24 horas. Tras la fase de fijación, las muestras se destiñeron mediante la aplicación de soluciones crecientes de etanol cada 30 minutos, (85%, 95% y 100%.) La última aplicación se realizó 3 veces hasta conseguir que los tejidos se destiñeran absolutamente. Para proceder con la tinción de callosa, se eliminó el etanol y se añadió tampón fosfato sódico, el cual se dejó actuar

durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el tampón y se añadió una solución de anilina 0,05% en el mismo tampón, a cada muestra. Se mantuvo en oscuridad durante una noche en agitación. Finalmente, se realizó el cambio de la solución de anilina y tras 1 hora en oscuridad y agitación se procedió a la observación de las muestras en el microscopio UV Leika 5000 y se midió la intensidad de fluorescencia con el programa ImageJ.

## **6. Análisis estadístico.**

El tratamiento estadístico de datos para distintos grupos de muestras se realizó mediante test ANOVA utilizando la prueba Post Hoc Tukey con un  $p$ -valor de 0,05 utilizando el Software SSPS de IBM.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a herida.

#### 1.1. Análisis en plantas 35S::*THT*.

Para el estudio del papel de *THT* en la respuesta a herida se utilizó la línea THT 7.3, que presentó los mayores niveles de expresión relativa de *THT* y acumulación de HCAAs (Campos et al, 2004), y su parental Money Maker (MM). Ambas líneas fueron heridas y se recogieron muestras a las 24 horas, tal y como se especifica en Materiales y Métodos. Posteriormente, se analizaron mediante qRT-PCR las diferencias en los niveles de expresión relativa de varios genes que participan en la señalización de herida, incluyendo *Twil*, *THT*, *TCI21*, *JAZ3*, *LoxD* y *PAL* (Figura 6), así como en la reparación del daño provocado por la acumulación de ROS causado por la misma, tales como *SOD*, *CAT* y *POD* (Figura 7).

En cuanto a la expresión del gen *THT* (Figura 6A), se comprobó su mayor expresión constitutiva en la línea transgénica sin herir, así como su mayor inducción por herida, siendo ambos resultados significativos. Estos resultados corroboran los previamente publicados por nuestro grupo (Campos et al., 2014).

La expresión relativa de genes como *Twil* y *JAZ3* (Figuras 6B y C) aumentó tras la herida, tanto en la línea transgénica THT 7.3 como en su parental, siendo esta inducción mayor en la línea transgénica. Asimismo, las plantas transgénicas THT 7.3 no heridas mostraron una menor expresión constitutiva de ambos genes con respecto a su parental MM. Todos estos resultados, a excepción de la inducción por herida de *Twil* en las plantas MM, resultaron ser significativos.

En cuanto a *TCI21* (Figura 6D), un inhibidor de quimiotripsina involucrado en la defensa contra herbívoros (Lison et al 2016), se observó una inducción significativa en sus niveles de expresión relativa como consecuencia de la herida en las plantas MM. Aunque también se observó dicha inducción en la línea transgénica THT 7.3 por la herida, ésta fue la mitad de la observada en las plantas control heridas. Las diferencias de inducción por herida entre las plantas transgénicas y las MM resultaron ser significativas.

La misma tendencia significativa se observó para los genes *LoxD* y *PAL* (Figuras 6E y 6F), implicados en la síntesis de JA y fenilpropanoides, respectivamente. Así, ambos genes presentaron una menor inducción por herida en las plantas transgénicas. Asimismo,

se observó que las plantas transgénicas sin herir presentan unos mayores niveles de expresión relativa de *PAL*. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que estas plantas transgénicas acumulan mayores niveles constitutivos de CT y FT (Campos et al 2014), cuya síntesis es dependiente de este enzima.

Nuestros resultados parecen indicar que las plantas transgénicas *THT* presentan una menor inducción de los genes que participan en la respuesta a herida, tales como *TCI21*, *LoxD* y *PAL*, sugiriendo que estas plantas que sobreexpresan HCCAs podrían ser más resistentes a los daños mecánicos debido a un refuerzo en la pared celular y, por tanto, requerir de una menor activación de esta respuesta defensiva. De hecho, las amidas FT y CT se unen a la pared celular (Clarke en 1982), lo que supone una mejor defensa física y química contra patógenos y plagas (Pearce et al 1998). Asimismo, se ha descrito un aumento en la acumulación de las mismas (Atsushi et al. 2000) y la posterior formación de dímeros entrecruzados en la pared celular tras la herida (King y Calhoun, 2005). Además, se ha descrito una mayor resistencia de estas plantas a la infección por bacteria *Pseudomonas syringae* llevada a cabo por infiltración, en la que la pared celular podría jugar un papel importante como barrera defensiva (Campos et al 2014).

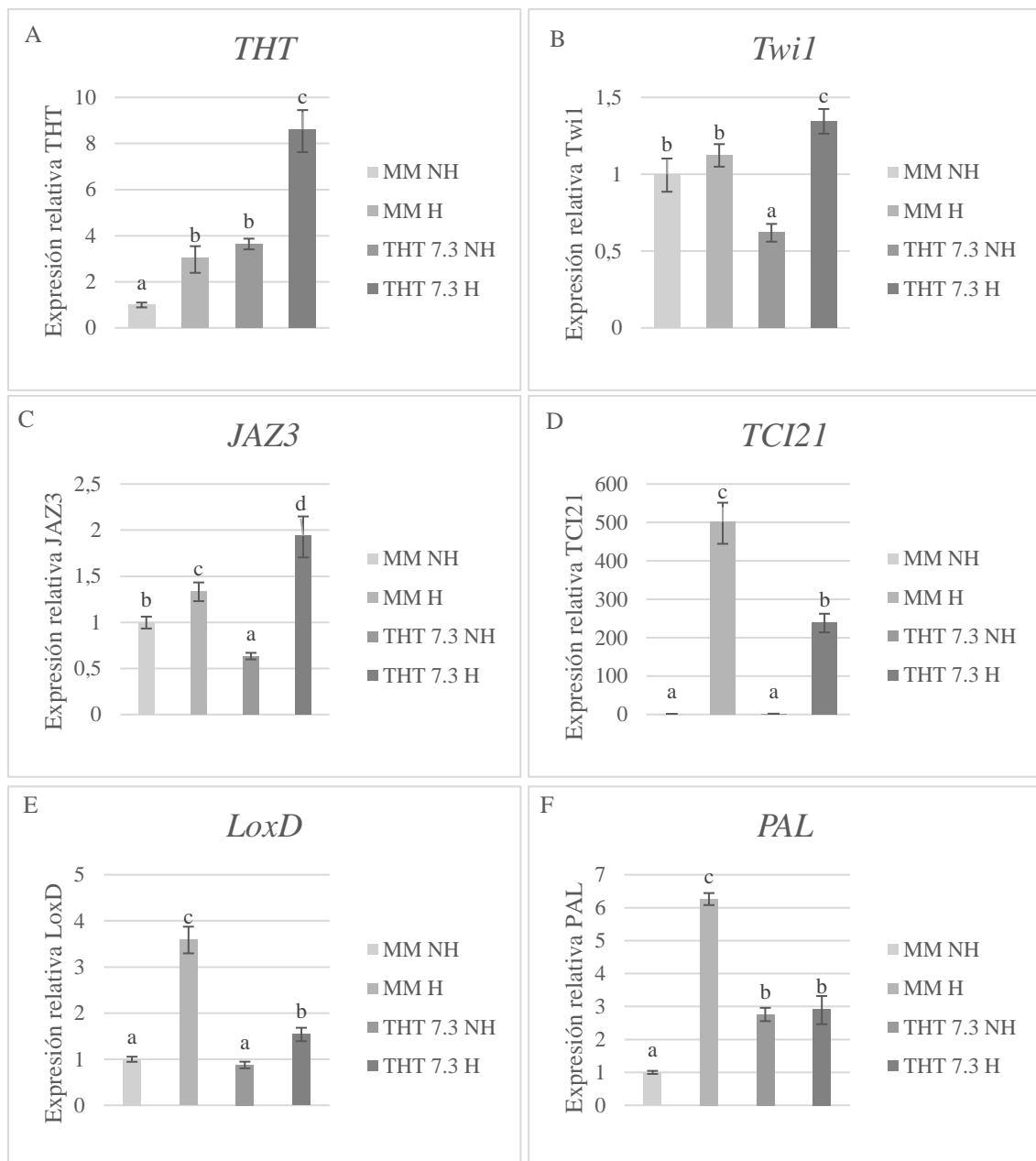


Figura 6: Expresión relativa de los genes *Twi1*, *THT*, *TCI21*, *JAZ3*, *LoxD* y *PAL* en hojas de plantas transgénicas de tomate *35S::THT* (THT 7.3) y su parental Money Maker (MM) después de 24h de la herida (H) y sin herir (NH). A: Expresión relativa del gen *THT*; B: Expresión relativa del gen *Twi1*; C: Expresión relativa del gen *JAZ3*; D: Expresión relativa del gen *TCI21*; E: Expresión relativa del gen *LoxD*; F: Expresión relativa del gen *PAL*. Se analizó mediante qRT-PCR el mRNA de hojas de las plantas de tomate para los distintos genes, utilizando el gen de la *actina* como gen de referencia para la normalización de los datos. Se tomó como valor de referencia 1 para los controles no heridos (MM NH). Las barras de error representan la media del error estándar de las tres réplicas del experimento. Las diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con test ANOVA con *p*-valor menor de 0,05 entre las distintas variedades de tomate.

Debido a que tiene lugar una acumulación de ROS *in situ* como consecuencia de la herida, se estudió la expresión relativa de los genes *CAT*, *SOD* y *POD* que codifican enzimas que participan en la disminución de la toxicidad de dichos ROS, tanto en la línea transgénica THT 7.3 como en su parental MM. Como se aprecia en la Figura 7, se observó una disminución significativa en los niveles de mRNA de estos tres genes en las líneas

de tomate transgénicas THT 7.3 sin herir. Estos resultados podrían explicarse por a la mayor acumulación constitutiva de FT y CT, que son compuestos con una alta capacidad antioxidante (Zacarés et al, 2007). Por otra parte, a diferencia de las plantas control, el comportamiento de estos tres genes tras la herida resultó ser el mismo, presentando un aumento significativo en los niveles de expresión relativa a las 24 h. Estos resultados podrían sugerir que las plantas transgénicas presentan un “*priming*” en la detoxificación de la acumulación de ROS provocada por la herida. Experimentos de cinéticas de inducción de estos genes en las líneas transgénicas serían de gran interés para confirmar esta hipótesis.

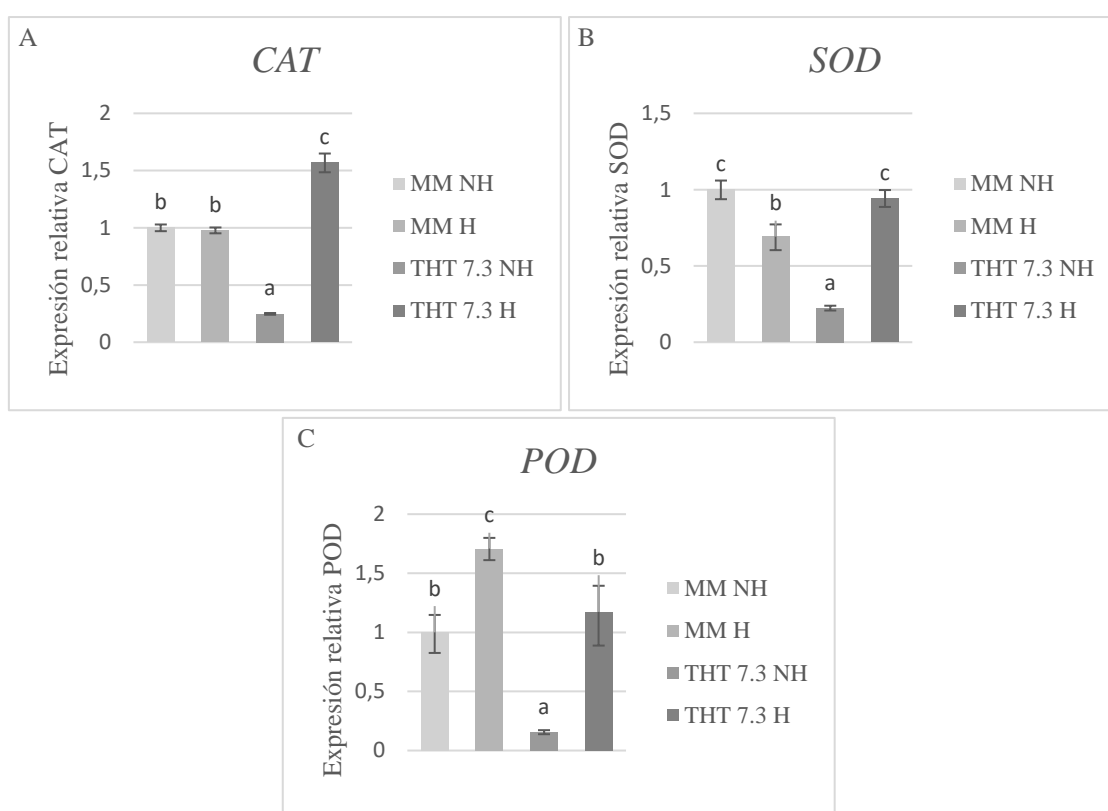


Figura 7: Expresión relativa de los genes *CAT*, *SOD* y *POD* en hojas de plantas de tomate Money Maker como control (MM) y *35S:THT* (THT 7.3) heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH). A: Expresión relativa del gen *CAT*; B: Expresión relativa del gen *SOD*; C: Expresión relativa del gen *POD*. Se analizó mediante qRT-PCR el mRNA de hojas de las plantas de tomate para los distintos genes, utilizando el gen de la *actina* como gen de referencia para la normalización de los datos. Se tomó como valor de referencia 1 para los controles no heridos (MM NH). Las barras de error representan la media del error estándar de las tres réplicas del experimento. Las letras diferentes representan diferencias significativas de acuerdo con test ANOVA con *p*-valor menor de 0,05 entre las distintas variedades de tomate.

De manera global, nuestros resultados sugieren que las plantas THT 7.3, que acumulan constitutivamente los antioxidantes HCAAs, presentan una menor expresión relativa de genes que participan en la detoxificación de ROS de manera constitutiva. Esto

sugiere que estas plantas podrían ser más resistentes al daño mecánico y, por tanto, requerir de una menor activación de la respuesta defensiva provocada por la herida.

## **1.2. Análisis en plantas transgénicas *RNAi\_Twi1*.**

Para estudiar el papel de *Twi1* en la respuesta a herida se utilizaron dos líneas de plantas de tomate transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* y su correspondiente fondo Money Maker (MM). Del mismo modo que para las plantas *35S:THT*, se realizó la herida y se tomaron las muestras después de 24 h. A continuación, se midió la expresión relativa de los genes implicados tanto en la propia respuesta a herida *Twi1*, *THT*, *TCI21*, *JAZ3*, *LoxD* y *PAL* (Figura 8), como los relacionados con la acumulación de ROS, tales como *SOD*, *CAT* y *POD*, mediante qRT-PCR (Figura 9).

Respecto al gen *Twi1* (Figura 8A), se observó una inducción significativa en plantas MM tras 24 horas de la herida. Esta inducción de *Twi1* coincide con los resultados de O'Donnell et al. (1998). Además, tal y como cabía esperar, se comprobó el silenciamiento de *Twi1* en ambas líneas transgénicas sin herir y heridas (Figura 6A; Campos et al, 2019).

En todos los genes analizados, a excepción de *PAL*, se produjo una mayor inducción causada por la herida en las líneas transgénicas respecto a la inducción observada en las plantas MM heridas, siendo estas diferencias significativas en todos los casos, excepto para el gen *JAZ3* en la línea transgénica *Twi1 28.3* (Figuras 8B-E).

Del mismo modo que para las plantas transgénicas *THT 7.3*, los niveles de expresión de *PAL* no mostraron un aumento significativo entre las líneas transgénicas sin herir y heridas, a diferencia de su fondo genético MM (Figura 8F).

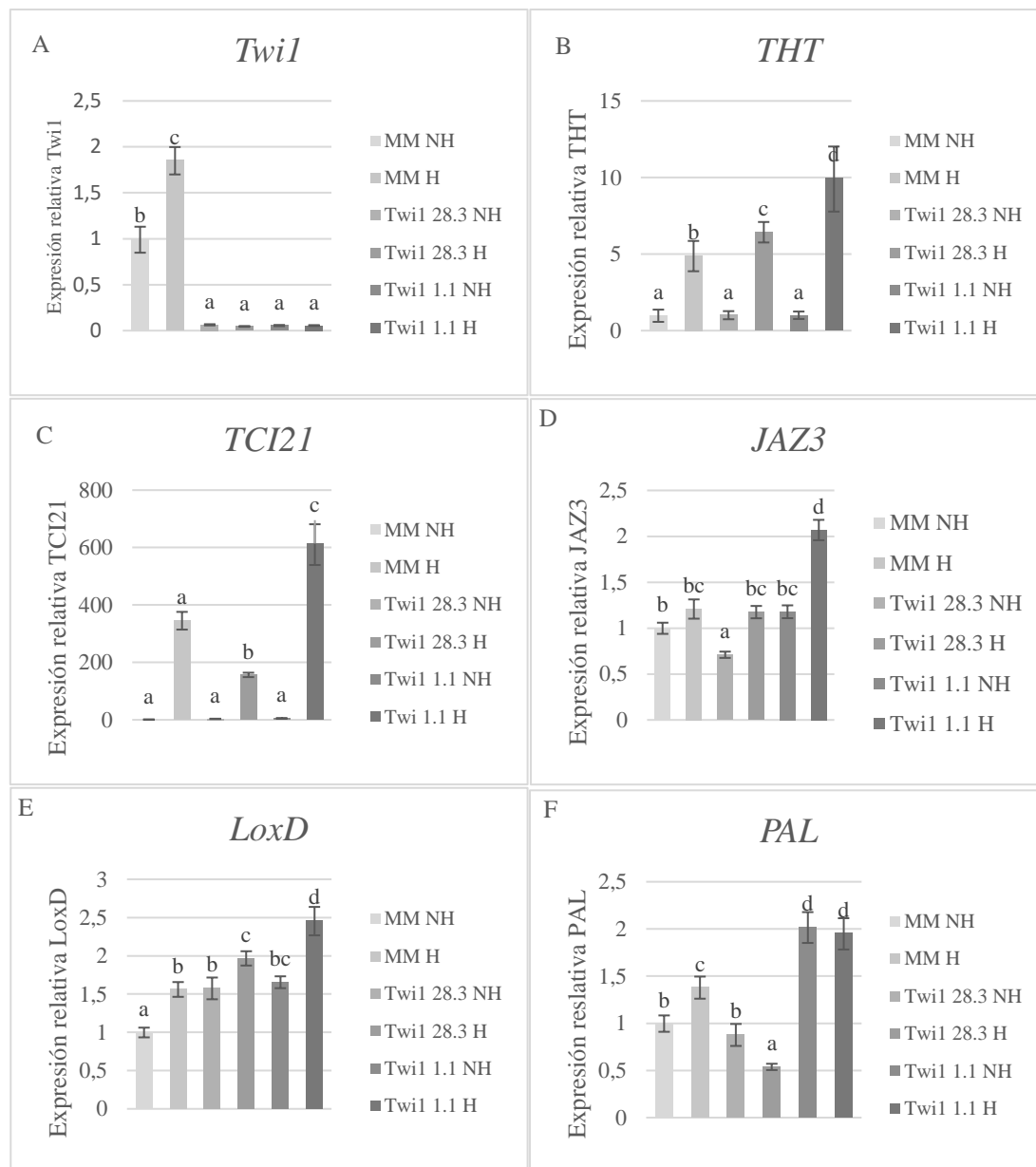


Figura 8: Expresión relativa de los genes *Twi1*, *THT*, *TCI21*, *JAZ3*, *LoxD* y *PAL* en hojas de plantas de tomate Money Maker como control (MM) y en transgénicas *Twi1* 1.1 y *Twi1* 28.3 heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH). A: Expresión relativa del gen *Twi1*; B: Expresión relativa del gen *THT*; C: Expresión relativa del gen *TCI21*; D: Expresión relativa del gen *JAZ3*; E: Expresión relativa del gen *LoxD*; F: Expresión relativa del gen *PAL*. Se analizó mediante qRT-PCR el mRNA de hojas de las plantas de tomate para los distintos genes, utilizando el gen de la *actina* como gen de referencia para la normalización de los datos. Se tomó como valor de referencia 1 para los controles no heridos (MM NH). Las barras de error representan la media del error estándar de las tres réplicas del experimento. Las letras representan diferencias significativas de acuerdo con test ANOVA con  $p$ -valor menor de 0,05 entre las distintas variedades de tomate.

Respecto a los niveles de expresión de genes que codifican enzimas implicados en la detoxificación causada por la explosión oxidativa de la herida, se observó que de manera constitutiva *SOD* y *POD* presentaron niveles de expresión relativa significativamente menores que las correspondientes parentales (Figuras 9B y 9C). Estos resultados coinciden con los observados en las líneas transgénicas *35S:THT* y podrían explicarse del mismo modo, pues las líneas transgénicas *RNAi\_Twi1* presentan unos mayores niveles de

acumulación del flavonoide quercetina, que ha sido descrito como un potente antioxidante de origen vegetal. Sin embargo, los niveles de expresión de *CAT* entre las plantas transgénicas y las MM no presentaron diferencias significativas (Figura 9A).

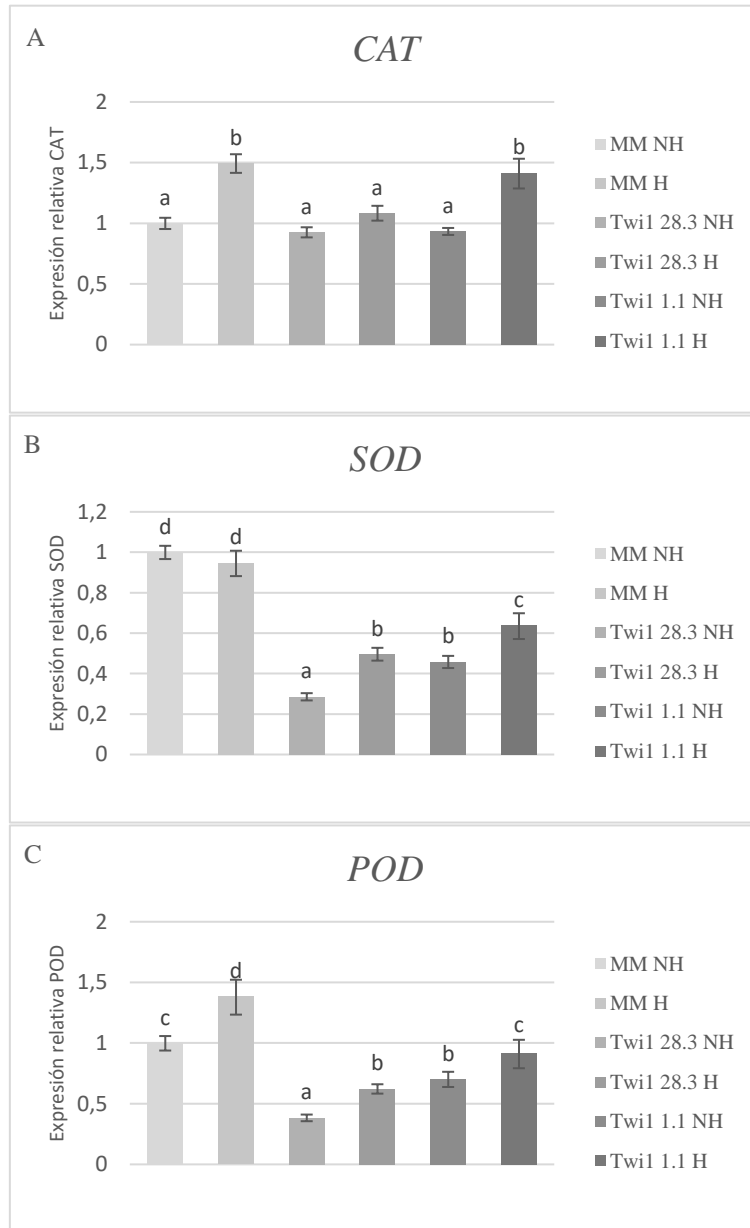


Figura 9: Expresión relativa de los genes *CAT*, *SOD* y *POD* en hojas de plantas de tomate Money Maker como control (MM) y Twi1 1.1 y Twi1 28.3 heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH). A: Expresión relativa del gen *CAT*; B: Expresión relativa del gen *SOD*; C: Expresión relativa del gen *POD*. Se analizó mediante qRT-PCR el mRNA de hojas de las plantas de tomate para los distintos genes, utilizando el gen de la *actina* como gen de referencia para la normalización de los datos. Se tomó como valor de referencia 1 para los controles no heridos (MM NH). Las barras de error representan la media del error estándar de las tres réplicas del experimento. Las diferentes letras representan la agrupación para diferencias significativas de acuerdo con test ANOVA con *p*-valor menor de 0,05 entre las distintas variedades de tomate.

Nuestros resultados parecen indicar que las plantas transgénicas *RNAi\_Twi1* presentan una mayor inducción de todos los genes de respuesta a herida analizados, excepto *PAL*, indicando que la glicosilación de los sustratos de *Twi1*, entre los que se encuentran la

quercetina y el kaempferol, podría estar reprimiendo la respuesta a herida. Asimismo, la mayor susceptibilidad de estas líneas al patógeno *TSWV* previamente descrita por nuestro grupo (Campos et al, 2019) podría ir acompañada de una mayor resistencia a insectos herbívoros, confirmando así el antagonismo entre JA y SA.

## **2. Acumulación de quercetina total en plantas de tomate *RNAi\_Twi1* heridas.**

Se ha demostrado en algunos estudios que la herida aumenta la resistencia sinérgica a otros estreses además de producir una mayor acumulación de flavonoides (Ortega-Hernández et al, 2019). Se quiso profundizar en la caracterización de las plantas transgénicas *Twi1* 1.1, analizando el contenido de quercetina en hojas a las 24 horas tras herir y en hojas no heridas, en comparación con su parental MM. Como se muestra en la Figura 10, se observaron niveles medios de acumulación de quercetina libre de 1,53 nmol por g de peso fresco (PF) en las plantas MM sin herir y de 0,88 nmol por g de PF en las plantas MM heridas. Para el caso de las plantas transgénicas *Twi1* 1.1 no heridas se obtuvieron valores medios de 1,86 nmol/g de PF, mientras que se detectaron valores medios de 1,08 nmol/g de PF en las plantas *Twi1* 1.1 heridas. Por lo tanto, nuestros resultados indican que la herida produce una disminución significativa de la acumulación de quercetina libre en plantas de tomate. Asimismo, se observa que el silenciamiento de *Twi1* produce una acumulación significativamente mayor de quercetina libre.

La misma tendencia se observó para los niveles de quercetina total (Figura 11). En concreto, se detectaron niveles medios de 22,76 nmol por g de PF en las plantas MM sin herir, que disminuyeron a valores de 14,11 nmol por g de PF en estas mismas plantas heridas. Con respecto a las plantas transgénicas *Twi1* 1.1, se detectaron valores medios de 32,96 nmol/g de PF en las plantas no heridas, frente a 27,61 nmol/g de PF detectados en las plantas *Twi1* 1.1 heridas. A diferencia de los niveles de quercetina libre, la reducción en los niveles de quercetina total en las plantas transgénicas heridas con respecto a las transgénicas sin herir no fue significativa.



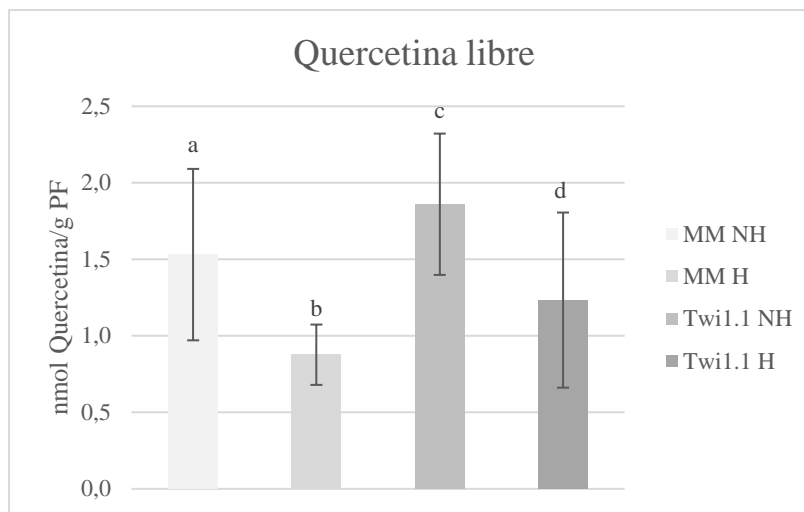


Figura 10: Niveles de quercetina libre en plantas de tomate Moneymaker y transgénicas Twi1.1 antes y después de herir. Se analizaron por HPLC (UPLC-Q-ToF-MS) los niveles de quercetina libre en hojas a las 24 horas de herir y no heridas. Nmol/g PF: nmol por gramo de peso fresco; MM: Variedad Money Maker; Twi1.1: Línea transgénica Twi1 1.1; NH: No herida; H: Herida. Las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas del experimento. Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con test ANOVA con  $p$ -valor menor de 0,05 entre las distintas variedades utilizadas.

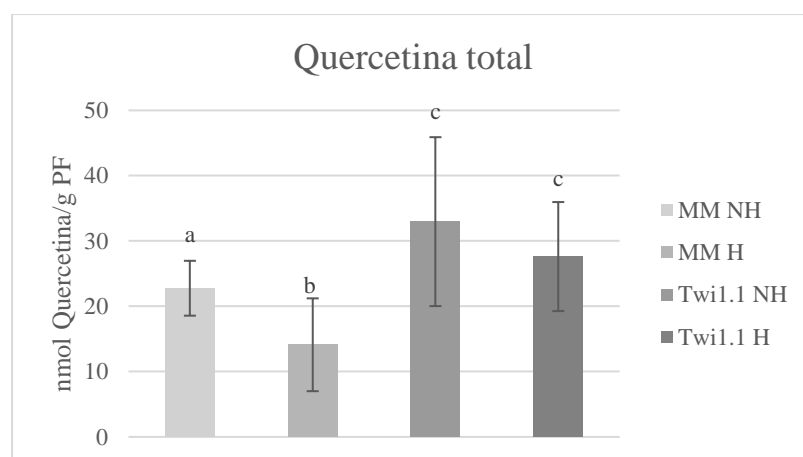


Figura 11: Niveles de acumulación de quercetina total (suma de quercetina libre y glicosilada) en plantas de tomate Money Maker y transgénicas Twi1 1.1 sin herir y heridas. Se analizó por HPLC (UPLC-Q-ToF-MS) los niveles de quercetina total en hojas a las 24 horas de herir y no heridas. Nmol/g PF: nmol por gramo de peso fresco; MM: Variedad Money Maker; Twi1.1: Línea transgénica Twi1 1.1; NH: No herida; H: Herida. Las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas del experimento. Diferentes letras representan diferencias significativas de acuerdo con test ANOVA con  $p$ -valor menor de 0,05 entre las distintas variedades utilizadas.

La disminución en la acumulación de quercetina en respuesta a la herida detectada coincide con los estudios de Tu y colaboradores (2016) en los que analizaron dos quimiotipos de cártamo. Tras la aplicación de MeJA, estas plantas presentaron una menor acumulación de los flavonoides kaempferol, D-fenilalanina y 3-O- $\beta$ -D-glucósido de quercetina.

Los flavonoides conjugados son utilizados por la planta para formar compuestos que refuercen la pared celular, como se sugiere en estudios de Karre y colaboradores (2019). Tras el silenciamiento de *Twil* sería de esperar una mayor acumulación de su sustrato, en este caso de quercetina libre, ya que no sería glicosilado en la misma medida. Tal es el caso de los estudios realizados por Liu y colaboradores (2015), en los que el silenciamiento de la glucosiltransferasa UGT71C5, que participa en la homeostasis del ABA mediante su glicosilación da lugar a ABA-Glucose ester (ABA-GE), produjo la acumulación de mayores niveles de ABA y menores de ABA-GE. Sin embargo, nuestros resultados contrastan con el fenotipo esperado para las plantas de tomate transgénicas *RNAi Twil*. Se han descrito muchos resultados polémicos en este sentido. Así, por ejemplo, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *AtSGT1*, que codifica una SA glicosiltransferasa, mostraron niveles más bajos de SA libre y conjugado, en comparación con las plantas control (Song et al, 2008) Por otra parte, plantas transgénicas de tabaco que tienen silenciada la glicosiltransferasa TOGT presentaron una caída en la cantidad de escopolina y escopoletina después de la infección por TMV, en comparación con las plantas control (Chong et al 2002). Además, plantas transgénicas que sobreexpresan TOGT acumulan mayores niveles de escopolina y escopoletina después de la inoculación con TMV (Gachon et al 2004). Por último, en estudios previos de nuestro laboratorio se observó que las mismas líneas de tomate *Twil* 1.1 y *Twil* 28.3, presentaron unos mayores niveles de acumulación de quercetina libre y total que sus respectivos parentales cuando eran infectadas con *TSWV*, sugiriendo que debían existir otras enzimas similares que participaran en la glicosilación de flavonoides además de *Twil*.

### **3. Análisis de callosa en respuesta a herida en plantas *RNAi\_Twil* y *35S::THT*.**

La herida induce la acumulación de callosa en el fruto del tomate (Lu et al., 2019). Además, algunos autores sugieren la existencia de un vínculo entre la vía de la JA y la deposición de callosa en tomate (Vicedo et al., 2009). Por ello, se quiso estudiar la posible implicación de *THT* y *Twil* en la deposición de callosa en respuesta a herida. Para ello quisimos estudiar la expresión génica de genes relacionados con la síntesis de callosa, así como la acumulación de callosa en hojas heridas mediante tinción de Azul de Anilina.

#### **3.1. Expresión génica de *CalS12*.**

Una vez estudiada la inducción de genes de defensa en la planta, y la acumulación de quercetina, nos dispusimos a estudiar la expresión génica relacionada con la deposición de callosa tras la herida. Para ello se midió la expresión relativa de *CalS12-like* (Adkar-

Purushothama et al, 2015) en hojas de tomate 24 horas tras la herida en todas las líneas utilizadas en este trabajo.

Como muestra la Figura 12, no se observó una inducción significativa como consecuencia de la herida del gen *CalS12-like* en las plantas MM, ni en las transgénicas analizadas. Estos resultados parecen indicar que o bien este gen no participa en la síntesis de callosa en respuesta a herida en hojas de tomate, o bien tal acumulación no tiene lugar. Estudios de inducción del gen *CalS11-like* (Adkar-Purushothama et al., 2015) u otros genes implicados en la síntesis de callosa, tales como la 12-oxofitodienoato reductasa 3 *OPR3* (Scalschi et al., 2014) podrían ayudar a discernir entre ambas posibilidades.

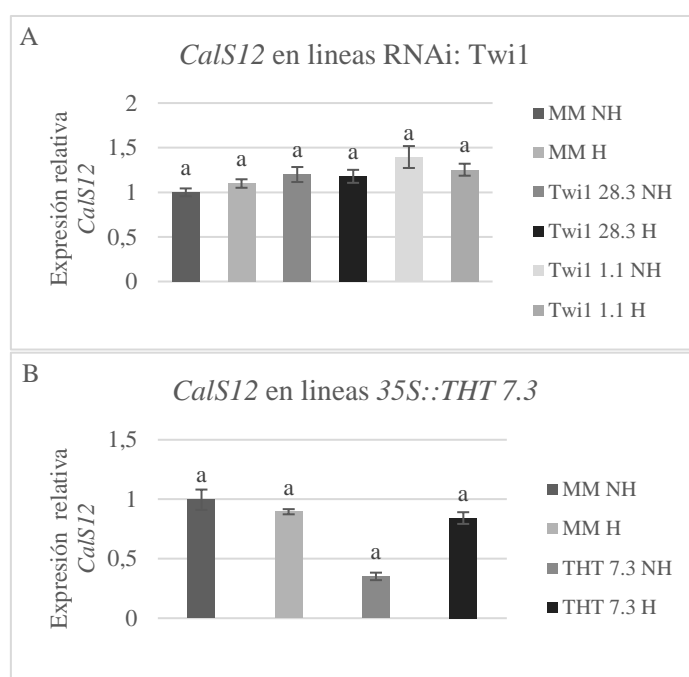


Figura 12 : Expresión relativa de *CalS12-like* en hojas de plantas de tomate Money Maker control (MM), hojas de plantas Twil 1.1 y Twil 28.3 y plantas THT 7.3 heridas 24 horas antes de la recogida (H) y sin herir (NH). A: Expresión relativa del gen *CalS12-like* en líneas Twil 1.1 y Twil 28.3 y su parental; B: Expresión relativa del gen *CalS12* en líneas THT 7.3 y su parental. Se analizó mediante qRT-PCR el mRNA de hojas de las plantas de tomate para los distintos genes, utilizando el gen de la actina como gen de referencia para la normalización de los datos. Se tomó como valor de referencia 1 para los controles no heridos (MM NH). Las barras de error representan la media del error estándar de las tres réplicas del experimento. Las letras representan diferencias significativas de acuerdo con test ANOVA con *p*-value menor de 0.05 entre las distintas variedades de tomate

### 3.2. Tinción de callosa con Azul de Anilina.

Se quiso estudiar el papel que podrían tener los productos generados por la actividad de THT y los sustratos o productos de Twil en la posible deposición de callosa producida por la herida, así como comprobar las diferencias fenotípicas que pudieran darse entre todas las líneas respecto a sus correspondientes líneas parentales MM. Para ello se realizó una tinción de anilina de la callosa en hojas heridas. Se estudiaron las heridas en hojas de

tomate de las líneas Twi1 1.1, Twi1 28.3, THT 7.3 y sus respectivos parentales y se midió la intensidad de fluorescencia con el programa ImageJ, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos para la intensidad de fluorescencia mostraron que en la línea THT 7.3 las hojas heridas presentaron una mayor fluorescencia de callosa teñida con azul de anilina alrededor de la herida que su correspondiente parental (Figura 13), aunque los resultados observados no fueron significativos.

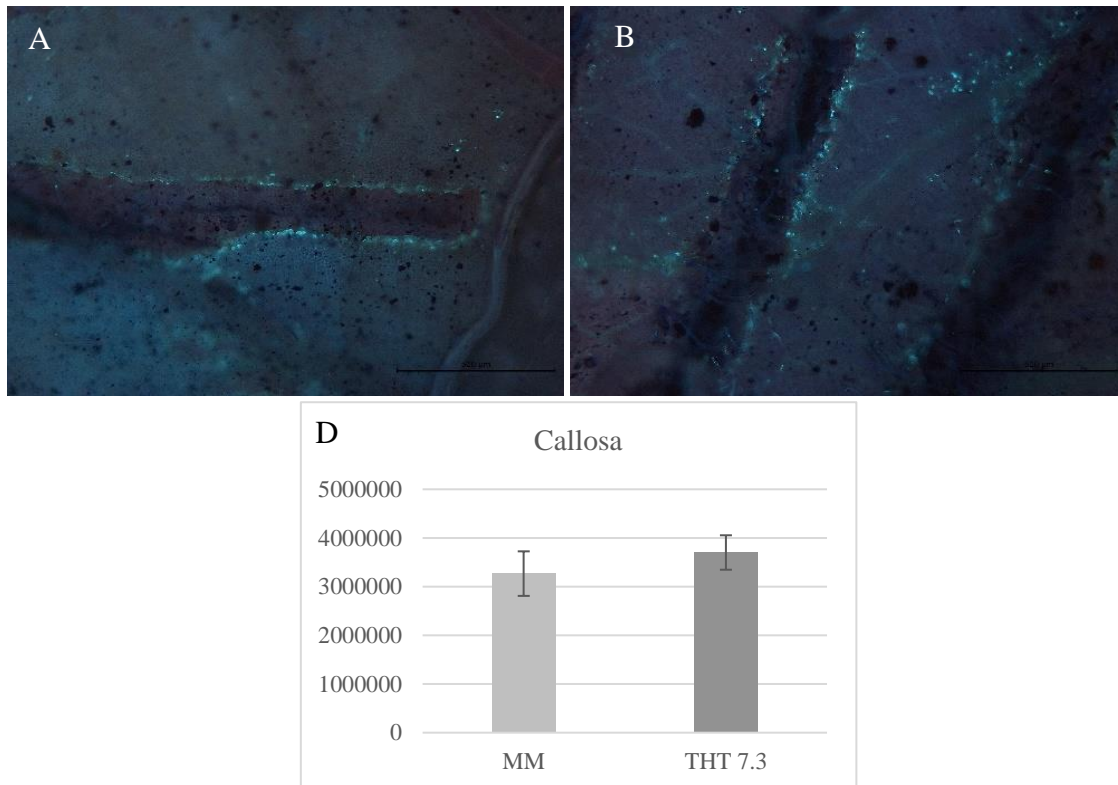


Figura 13: Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de línea THT 7.3 y su parental. Fueron heridas con pinzas 24 horas antes de la recogida. A: Tinción de callosa de heridas en MM; B: Tinción de callosa de heridas en THT 7.3. C: Fluorescencia de callosa teñida con azul de anilina, medida con ImageJ.

Con respecto a la línea transgénica Twi1 28.3 se observó una menor acumulación de callosa con respecto a su parental, mientras que las heridas de hojas de la línea de Twi1 1.1 no mostraron diferencias respecto a su parental en la tinción de callosa con Anilina (Figura 14). Las diferencias no fueron significativas para ninguna de las dos líneas transgénicas.

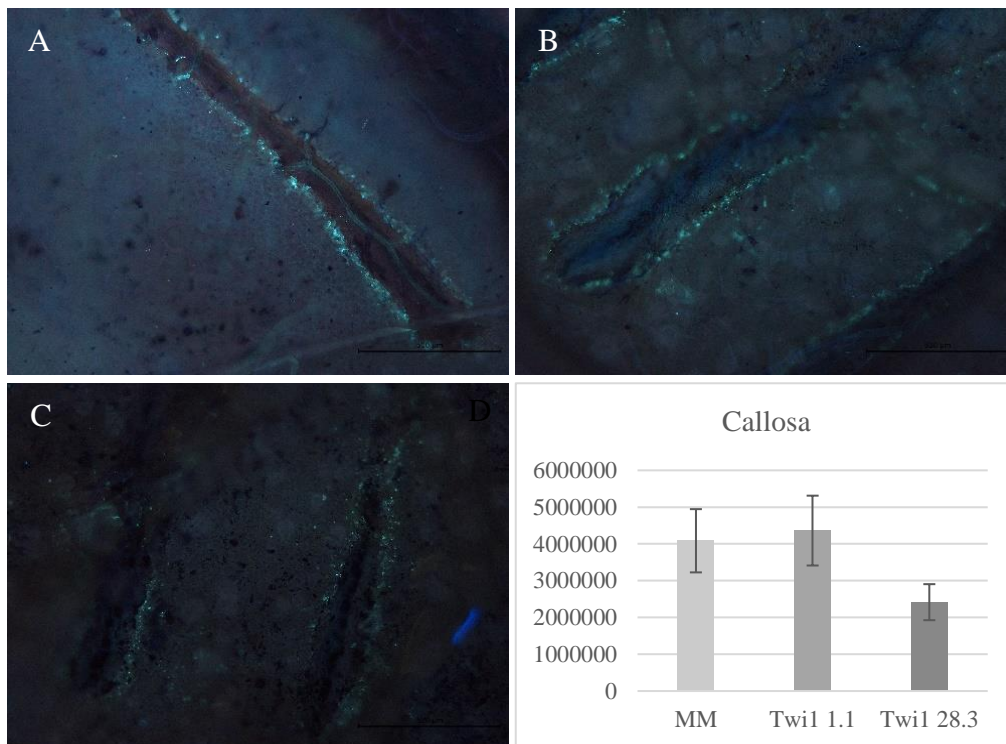


Figura 14: Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de las líneas Twi1 1.1, Twi1 28.3 y su parental. Fueron heridas con pinzas 24 horas antes de la recogida. A: Tinción de callosa de heridas en MM; B: Tinción de callosa de heridas en Twi1 1.1; C: Tinción de callosa de heridas en Twi1 28.3; D: Fluorescencia de callosa teñida con azul de anilina, medida con ImageJ en tres hojas de cada variedad.

La acumulación de fluorescencia de callosa alrededor de la herida podría deberse a la necrosis que se produce y coincidiría con el estudio de Dai y colaboradores (1996) en el que observaron que la infección con *Xanthomonas campestris*, produce una acumulación de callosa en el borde de la zona necrótica. Se ha descrito que se produce la acumulación de compuestos fenólicos en las zonas de infección de *Xanthomonas campestris*, en concreto, observando la acumulación de flavonoides dentro de las papilas enriquecidas con callosa y en las paredes celulares de la planta infectada (Dai et al, 1996).

En un principio, se describió la deposición de callosa como un refuerzo de la pared celular para impedir la penetración de patógenos y mejorar así la resistencia (Stone and Clarke, 1992). Sin embargo, el mutante en la síntesis de callosa *pmr4* presentó una mayor activación de las defensas y señalización mediada por SA, presentando por tanto un aumento en la resistencia a patógenos (Nishimura et al, 2003). Estos resultados son contradictorios con los de Ellinger y colaboradores (2013) que demostraron que la sobreexpresión de *Cals12* mejora la deposición de la callosa y aumenta la resistencia al oídio; u otros estudios en los que se observó que la callosa en paredes celulares constituye una barrera contra patógenos, y constituye un indicador de la reacción de defensa de la planta (Luna et al., 2011; Han et al 2021).

Aunque nuestros resultados son preliminares, hemos observado una cierta tendencia de las plantas *35S::THT* a acumular más callosa, mientras que las plantas *RNAi\_Twi* podrían presentar un defecto en su acumulación. En el futuro, se llevarán a cabo nuevos experimentos para corroborar esta hipótesis.

En el presente trabajo hemos observado que los genes *THT* y *Twi1* podrían jugar un papel en la respuesta defensiva activada por la herida de plantas de tomate, través de la regulación del metabolismo de las HCAAs y de los flavonoides, respectivamente. El análisis de la totalidad de compuestos fenólicos acumulados en las plantas transgénicas *35S::THT* y *RNAi\_Twi1* sin herir y heridas con respecto a sus correspondientes controles que está siendo llevado a cabo en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (Murcia) resultará de gran interés para comprender mejor el papel de los metabolitos secundarios en la respuesta a herida de plantas de tomate.

## CONCLUSIONES.

1. La línea *THT 7.3* presenta una menor expresión relativa de genes que participan en la detoxificación de ROS de manera constitutiva y una mayor inducción de los genes de respuesta a herida.
2. Las líneas *RNAi\_Twi1* presentan una mayor inducción de los genes de respuesta a herida, indicando que la glicosilación de los sustratos de *Twi1*, podría estar reprimiendo la respuesta a herida.
3. La herida produce una disminución significativa de la acumulación de quercetina libre y total en plantas de tomate.
4. El silenciamiento de *Twi1* produce una acumulación significativamente mayor de quercetina libre y total en plantas de tomate.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Adkar-Purushothama, C. R., Brosseau, C., Giguère, T., Sano, T., Moffett, P., & Perreault, J. P. (2015). Small RNA derived from the virulence modulating region of the potato spindle tuber viroid silences callose synthase genes of tomato plants. *Plant Cell*, 27(8), 2178–2194. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00523>
- Akhtar, K. P., Saleem, M. Y., Asghar, M., Ahmad, M., & Sarwar, N. (2010). Resistance of *Solanum* species to Cucumber mosaic virus subgroup IA and its vector *Myzus persicae*. *European Journal of Plant Pathology*, 128(4), 435–450. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9670-5>
- Amil-Ruiz, F., Garrido-Gala, J., Gadea, J., Blanco-Portales, R., Muñoz-Mérida, A., Trelles, O., De Los Santos, B., Arroyo, F. T., Aguado-Puig, A., Romero, F., Mercado, J. Á., Pliego-Alfaro, F., Muñoz-Blanco, J., & Caballero, J. L. (2016). Partial activation of SA- and JA-defensive pathways in strawberry upon *colletotrichum acutatum* interaction. *Frontiers in Plant Science*, 7(2016JULY), 0–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01036>
- An Y., Kang S.C., Kim K.D., Hwang B.K., Jeun Y. 2010. Enhanced defense responses of tomato plants against late blight pathogen *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with rhizobacteria. *Crop Protection* 29: 1406-1412. [DOI: 10.1016/j.cropro.2011.03.031]
- Andre, E. and Hou, K.-W. (1932) The presence of a lipoid oxidase in soybean, *Glycine soya* Lieb. *Comptes Rendues d'Academie des Sciences (Paris)*, **194**, 645–647.
- Atsushi ISHIHARA, Naoki KAWATA, Tetsuya MATSUKAWA, Hajime IWAMURA, *Induction of N-Hydroxycinnamoyltyramine Synthesis and Tyramine N-Hydroxycinnamoyltransferase (THT) Activity by Wounding in Maize Leaves*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, Volume 64, Issue 5, Pages 1025-1031, Released February 15, 2005, Online ISSN 1347-6947, Print ISSN 0916-8451, <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1025>
- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., & Csiszár, J. (2015). Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology*, 176, 192–201. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.12.014>
- Bellés JM, Garro R, Pallás V, Fayos J, Rodrigo I, Conejero V. Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta*. 2006;223(3): 500–11.
- Beneloujaephajri, E., Costa, A., L'Haridon, F., Métraux, J. P., & Binda, M. (2013). Production of reactive oxygen species and wound-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Botrytis cinerea* are preceded and depend on a burst of calcium. *BMC Plant Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-160>
- Bergey, D. R., Howe, G. A., & Ryan, C. A. (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proceedings of the National*



*Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12053–12058.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12053>

- Bhonwong, A., Stout, M. J., Attajarusit, J., & Tantasawat, P. (2009). Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm *Helicoverpa armigera* and beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Journal of Chemical Ecology*, 35(1), 28–38.  
<https://doi.org/10.1007/s10886-008-9571-7>
- Bosch, M., Berger, S., Schaller, A., & Stintzi, A. (2014). Jasmonate-dependent induction of polyphenol oxidase activity in tomato foliage is important for defense against *Spodoptera exigua* but not against *Manduca sexta*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1–15.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0257-8>
- Botella, J. R., Editors, M. A. B., & Walker, J. M. (2016.). *Plant Signal Transduction IN Series Editor*
- Bottcher, C., von Roepenack-Lahaye, E., Schmidt, J., Schmotz, C., Neumann, S., Scheel, D., and Clemens, S. 2008. Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147:2107-2120.
- Bowles, D. J. (1993). Local and systemic signals in the wound response. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 4, Issue 2, pp. 103–111).  
<https://doi.org/10.1006/scel.1993.1013>
- Bowles DJ, Isayenkova J, Lim EK & Poppenberger B (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol* 8, 254–263.
- Bowles D, Lim EK, Poppenberger B, Vaistij FE (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu Rev Plant Biol* 57: 567–597
- BROOKS, F. T. (1928). Disease Resistance in Plants. *New Phytologist*, 27(2), 85–97.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1928.tb06733.x>
- Campos, L., Lisón, P., López-Gresa, M. P., Rodrigo, I., Zacarés, L., Conejero, V., & Bellés, J. M. (2014). Transgenic tomato plants overexpressing tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase exhibit elevated hydroxycinnamic acid amide levels and enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10), 1159–1169. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0104-R>
- Campos, L., Granell, P., Tárraga, S., López-Gresa, M. P., Conejero, V., Bellés, J. M., Rodrigo, I., and Lisón, P. 2014. Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiol. Biochem.* 77:35-43.
- Campos, L., López-Gresa, M. P., Fuertes, D., Bellés, J. M., Rodrigo, I., & Lisón, P. (2019). Tomato glycosyltransferase Twil plays a role in flavonoid glycosylation and defence against virus. *BMC Plant Biology*, 19(1), 1–17.  
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-2063-9>

- Chen, H., Jones, A. D., & Howe, G. A. (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters*, 580(11), 2540–2546. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.070>
- Chen, H., Wilkerson, C. G., Kuchar, J. A., Phinney, B. S., & Howe, G. A. (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19237–19242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509026102>
- Chen, X. Y., & Kim, J. Y. (2009). Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4(6), 489–492. <https://doi.org/10.4161/psb.4.6.8359>
- Chen Y., Halterman D.A. 2011. Phenotypic characterization of potato late blight resistance mediated by the broad-spectrum resistance gene *RB*. *Phytopathology* 101: 263-270. [DOI: 10.1094/PHYTO-04-10-0119]
- Chico, J. M., Chini, A., Fonseca, S., & Solano, R. (2008). JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(5), 486–494. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.003>
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., & Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature06006>
- Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B, Saindrenan P. (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell*.;14(5):1093–107.
- Clarke, D. D. 1982. Active defence mechanisms in plants. Pages 321-322 in: *The Accumulation of Cinnamic Acid Amides in the Cell Walls of Potato Tissue as an Early Response to Fungal Attack*. R. K. S, Wood, ed. Plenum Press, New York.
- Clay, N. K., Adio, A. M., Denoux, C., Jander, G., & Ausubel, F. M. (2009). Glucosinolate Metabolites Required for an. *Science*, 323(5910), 95–101. <https://doi.org/10.1126/science.1164627>.Glucosinolate
- Clifton-Hadley, F. A., Alexander, T. J., Enright, M. R., & Guise, J. (1984). Monitoring herds for *Streptococcus suis* type 2 by sampling tonsils of slaughter pigs. *The Veterinary Record*, 115(22), 562–564. <https://doi.org/10.1136/vr.115.22.562>
- Copping, L. (1998). Systemic acquired resistance. *Pesticide Outlook*, 9(2), 34. <https://doi.org/10.2307/3870231>
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 48(July 1997), 355–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355>
- Creissen G.P., Edwards E.A., Mullineaux P.M. 1994. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: Foyer C.H., Mullineaux, P.M. (eds) *Causes of Photooxidative Stress*

- and Amelioration of Defense Systems in Plants. Pp 343–364. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Csizinszky, A.A., Schuster, D.J., Jones, J.B., van Lenteren, J.C., 2005. Crop protection. In: Heuvelink, E. (Ed.), *Tomatoes*. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA, pp. 199–235.
- Culvenor, C.C. 1973. Alkaloids. p. 375-446. In G.W. Bulter and R.W. Bailey (ed.) *Chemistry and biochemistry of herbage*. Vol. 1. Academic Press, New York.
- Currier H.B. 1957. Callose substance in plant cells. *American Journal of Botany* 44: 478-488. [DOI: 10.2307/2438916]
- Dai G. H., M. Nicole, C. Andary, C. Martinez, E. Bresson, B. Boher, J.F. Daniel, J.P. Geiger, (1996). Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49, 5, 285-306, <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0055>.
- D'Auria JC, Gershenzon J. 2005. The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Curr Opin Plant Biol.* 8(3):308–16.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Defence Responses To Infection. *Nature*, 411(June).
- de la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2018). Phenolic compounds. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science*, 25(6), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- Donnell, P. J. O., Truesdale, M. R., Calvert, C. M., Dorans, A., Roberts, M. R., & Bowles, D. J. (1998). *SHORT COMMUNICATION A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals.* 14(November 1997), 137–142.
- Duffey, S. S., & Stout, M. J. (1996). Antinutritive and Toxic Components of Plant Defense Against Insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 32(1), 3–37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1996\)32:1<3::AID-ARCH2>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1996)32:1<3::AID-ARCH2>3.0.CO;2-1)
- Egelund J, Skjøt M, Geshi M, Ulvskov P, Peterson BL (2004) A complementary bioinformatics approach to identify potential plant cell wall glycosyltransferase-encoding genes. *Plant Physiol* 136: 2609–2620
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S. C., & Voigt, C. A. (2013). Elevated early callose deposition results in complete penetration resistance to powdery mildew in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161(3), 1433–1444. <https://doi.org/10.1104/pp.112.211011>

- Engelberth, J., Contreras, C. F., & Viswanathan, S. (2012). Transcriptional analysis of distant signaling induced by insect elicitors and mechanical wounding in *Zea mays*. *PLoS One*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034855>
- Facchini, P. J., Hagel, J., and Zulak, K. G. 2002. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: Physiology and biochemistry. *Can J. Bot.* 80:577- 589.
- FAOSTAT. January 2021. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(19), 7713–7716. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.19.7713>
- Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M. V., Carreras, A., Valderrama, R., Begara-Morales, J. C., Hernández, L. E., Corpas, F. J., & Barroso, J. B. (2011). Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. *Journal of Plant Physiology*, 168(11), 1303–1308. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.020>
- Foyer, C. H., & Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology*, 155(1), 93–100. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166181>
- Fritig, B., Heitz, T., & Legrand, M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 16–22. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80025-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80025-3)
- Gachon C, Baltz R, Saindrenan P.2004. Over-expression of a scopoletin glucosyltransferase in *Nicotiana tabacum* leads to precocious lesion formation during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus but does not affect virus resistance. *Plant Mol Biol*;54(1):137–46.
- Gachon CMM, Langlois-Meurinne M & Saindrenan P (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci* 10, 542–549.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. *Entomologia Agrícola*. Fealq, Piracicaba, Brazil.
- Gatehouse, J. A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: A dynamic interaction. *New Phytologist*, 156(2), 145–169. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x>
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2011). Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7), 1147–1154.

- Glas, J. J., Schimmel, B. C. J., Alba, J. M., Escobar-Bravo, R., Schuurink, R. C., & Kant, M. R. (2012). Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 17077–17103. <https://doi.org/10.3390/ijms131217077>
- Gómez, S., Ferrieri, R. A., Schueller, M., & Orians, C. M. (2010). Methyl jasmonate elicits rapid changes in carbon and nitrogen dynamics in tomato. *New Phytologist*, *188*(3), 835–844. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03414.x>
- Grandmaison, J., Olah, G. M., Vancalsteren, M. R., and Furlan, V. 1993. Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3:155-164.
- Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1989). Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *40*(1), 347–369. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002023>
- Halim, V. A., Vess, A., Scheel, D., & Rosahl, S. (2006). The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology*, *8*(3), 307–313. <https://doi.org/10.1055/s-2006-924025>
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Biology*, *48*, 575–607. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.575>
- Harris, V., Jiranek, V., Ford, C. M., & Grbin, P. R. (2010). Inhibitory effect of hydroxycinnamic acids on *Dekkera* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(2), 721–729. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2352-6>
- Heredia, J. B., & Cisneros-Zevallos, L. (2009). The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce. *Food Chemistry*, *115*(4), 1500–1508. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.078>
- Heredia J.B., Cisneros-Zevallos L. 2009. The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce. *Food Chem*;115:1500–1508. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.078.
- Hofmann, J., El Ashry, A. N., Anwar, S., Erban, A., Kopka, J., & Grundler, F. (2010). Metabolic profiling reveals local and systemic responses of host plants to nematode parasitism. *Plant Journal*, *62*(6), 1058–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04217.x>
- Harborne, J.B., 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst. Ecol.* *27* (4), 335–367
- Houmani, H., Rodríguez-Ruiz, M., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2018). Mechanical wounding promotes local and long distance response in the halophyte *Cakile*

maritima through the involvement of the ROS and RNS metabolism. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 74, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.06.008>

- Handrick, V., Vogt, T., and Frolov, A. 2010. Profiling of hydroxycinnamic acid amides in *Arabidopsis thaliana* pollen by tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 398:2789-2801.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989) Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347-369. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002023>
- Hood M.E., Shew H.D. 1996. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* 86: 704-708. [DOI: 10.1094/Phyto-86-704]
- Howe, Gregg. (2004). Jasmonates as Signals in the Wound Response. *Journal of Plant Growth Regulation*. 23. 223-237. 10.1007/s00344-004-0030-6.
- Ibanez, F., Bang, W. Y., Lombardini, L., & Cisneros-Zevallos, L. (2019). Solving the controversy of healthier organic fruit: Leaf wounding triggers distant gene expression response of polyphenol biosynthesis in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*). *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55033-w>
- Ishihara, A., Hashimoto, Y., Tanaka, C., Dubouzet, J. G., Nakao, T., Matsuda, F., Nishioka, T., Miyagawa, H., & Wakasa, K. (2008). The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *Plant Journal*, 54(3), 481–495. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03441.x>
- Jacobo-Velázquez, D. A., Martínez-Hernández, G. B., Del C. Rodríguez, S., Cao, C. M., & Cisneros-Zevallos, L. (2011). Plants as biofactories: Physiological role of reactive oxygen species on the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6583–6593. <https://doi.org/10.1021/jf2006529>
- Jacobs, A. K., Lipka, V., Burton, R. A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., & Fincher, G. B. (2003). An *Arabidopsis* Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell*, 15(11), 2503–2513. <https://doi.org/10.1105/tpc.016097>
- Jeandet, P., Clément, C., Courot, E., & Cordelier, S. (2013). Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14136–14170. <https://doi.org/10.3390/ijms140714136>
- Jones, J.D.G., D. J. L. (2006). H E P L a N T Imm U N E S Y S T. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Karre S, Kumar A, Yogendra K, Kage U, Kushalappa A, Charron JB. HvWRKY23 regulates flavonoid glycoside and hydroxycinnamic acid amide biosynthetic genes

in barley to combat Fusarium head blight. *Plant Mol Biol.* 2019 Aug;100(6):591-605. doi: 10.1007/s11103-019-00882-2. Epub 2019 May 16.

- Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., Sheng, Y. H., & Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 7100–7105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802332105>
- Kawashima, S., Hayashi, M., Takii, T., Kimura, H., Zhang, H. L., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Murata, K., Oomoto, Y., and Onozaki, K. 1998. Serotonin derivative, *N*-(*p*-coumaroyl) serotonin, inhibits the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 by endotoxin-stimulated human bloodmonocytes. *J. Interferon Cytokine Res.* 18:423–428.
- King, R.R. and Calhoun, L.A. (2005) Characterization of crosslinked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. *Phytochemistry* 66, 2468–2473
- Keller, H., Blein, J. P., Bonnet, P., & Ricci, P. (1996). Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology*, 110(2), 365–376. <https://doi.org/10.1104/pp.110.2.365>
- Koja, E., Ohata, S., Maruyama, Y., Suzuki, H., Shimosaka, M., & Taguchi, G. (2018). Identification and characterization of a rhamnosyltransferase involved in rutin biosynthesis in fagopyrum esculentum (common buckwheat). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 82(10), 1790–1802. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1491286>
- Lao NT, Long D, Kiang S, Coupland G, Shoue DA, Carpita NC, Kavanagh TA (2003) Mutation of a family 8 glycosyltransferase gene alters cell wall carbohydrate composition and causes a humidity-sensitive semi-sterile dwarf phenotype in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 53: 687–701
- Lee, D. G., Park, Y., Kim, M. R., Jung, H. J., Seu, Y. B., Hahm, K. S., and Woo, E. R. 2004. Antifungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnol. Lett.* 26:1125-1130.
- Leon, J., Rojo, E., Titarenko, E., & Sánchez-Serrano, J. J. (1998). Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin in Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics*, 258(4), 412–419. <https://doi.org/10.1007/s004380050749>
- León, J., Rojo, E., & Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(354), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jxb/52.354.1>
- Lim EK, Doucet CJ, Hou B, Jackson RG, Abrams SR, Bowles DJ (2005) Resolution of (+)-abscisic acid using an Arabidopsis glycosyltransferase. *Tetrahedron Asymmetry* 16: 143–147

- Lisón, P., Rodrigo, I., & Conejero, V. (2006). A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiology*, *142*(3), 1329–1339. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086587>
- López-Gresa, M. P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., and Conejero, V. 2011. Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environ. Exp. Bot.* *74*:216-228.
- Lu H., Wang J., Gao R., Ye, Zhao G. (2019) Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 86, 172-187, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.020>.
- Luo, J., Fuell, C., Parr, A., Hill, L., Bailey, P., Elliott, K., Fairhurst, S. A., Martin, C., and Michael, A. J. 2009. A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in Arabidopsis seed. *Plant Cell* *21*:318-333.
- Lup, S. D., Tian, X., Xu, J., & Pérez-Pérez, J. M. (2016). Wound signaling of regenerative cell reprogramming. *Plant Science*, *250*, 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.012>
- Maffei, M. E., Mithöfer, A., & Boland, W. (2007). Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, *68*(22–24), 2946–2959. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.016>
- Mann, R. S., Ali, J. G., Hermann, S. L., Tiwari, S., Pelz-Stelinski, K. S., Alborn, H. T., & Stelinski, L. L. (2012). Induced release of a plant-defense volatile “deceptively” attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathogens*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002610>
- McGurl, B., & Ryan, C. A. (1992). The organization of the prosystemin gene. *Plant molecular biology*, *20*(3), 405–409. <https://doi.org/10.1007/BF00040600>
- Meech, R., Hu, D. G., Mckinnon, R. A., Mubarakah, S. N., Haines, A. Z., Nair, P. C., Rowland, A., Mackenzie, P. I., Meech, R., Dg, H., Ra, M., Sn, M., Az, H., Pc, N., & Rowland, A. (2020). THE UDP-GLYCOSYLTRANSFERASE (UGT) SUPERFAMILY : NEW MEMBERS , NEW FUNCTIONS , AND NOVEL PARADIGMS. 1153–1222. <https://doi.org/10.1152/physrev.00058.2017>
- Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H. S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., & Howe, G. (2008). Critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of Arabidopsis JAZ proteins. *Plant Journal*, *55*(6), 979–988. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03566.x.A>
- Mhatre V. Ho and Kelsey C. Martin, J.-A. L. (2012). NIH Public Access. *Bone*, *23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10886-014-0468-3.JASMONATE-TRIGGERED>
- Minibayeva, F., Beckett, R. P., & Kranner, I. (2015). Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding. *Phytochemistry*, *112*(1), 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.008>



- Nagatsu, A., Zhang, H. L., Mizukami, H., Okuyama, H., Sakakibara, J., Tokuda, H., and Nishino, H. 2000. Tyrosinase inhibitory and anti-tumor promoting activities of compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and cotton (*Gossypium hirsutum* L.) oil cakes. *Nat. Prod. Lett.* 14:153-158.
- Naoumkina, M. A., Zhao, Q., Gallego-Giraldo, L., Dai, X., Zhao, P. X., & Dixon, R. A. (2010). Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, 11(6), 829–846. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00648.x>
- Negrel, J., and Martin, C. 1984. The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 23:2797-2801
- Negrel, J., and Javelle, F. 1997. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA: Tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl) transferase from tobacco cell-suspension cultures. *Eur. J. Biochem.* 247:1127-1135.
- Negrel, J., Javelle, F., and Paynot, M. 1993. Wound induced tyramine hydroxycinnamoyl transferase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber disks. *J. Plant Physiol.* 142:518-524.
- Negrel, J., and Lherminier, J. 1987. Peroxidase mediated integration of tyramine into xylem cell-walls of tobacco-leaves. *Planta* 172:494-501.
- Newman, M. A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M. J., and Dow, J. M. 2001. Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by *hrp* gene-dependent and *hrp* gene-independent mechanisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:785-792.
- Nijveldt, R. J., Van Nood, E., Van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), 418–425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>
- Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H., & Somerville, S. C. (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, 301(5635), 969–972. <https://doi.org/10.1126/science.1086716>
- Nowicki, M., Nowakowska, M., Kłosińska, U., Golik, P., Kozik, E. U., & Lichocka, M. (2012). A Simple Dual Stain for Detailed Investigations of Plant-Fungal Pathogen Interactions. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 77, 61–74. <https://doi.org/10.2478/v10032-012-0016-z>
- O'Donnell PJ, TruesdaleMR, Calvert CM, Dorans A, RobertsMR, BowlesDJ (1998) A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant J* 14: 137–142
- Oka, K., Okubo, A., Kodama, M., & Otani, H. (2006). Detoxification of  $\alpha$ -tomatine by tomato pathogens *Alternaria alternata* tomato pathotype and *Corynespora cassiicola*

and its role in infection. *Journal of General Plant Pathology*, 72(3), 152–158.  
<https://doi.org/10.1007/s10327-005-0262-8>

- Orozco-Cárdenas, M. L., Narváez-Vásquez, J., & Ryan, C. A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, 13(1), 179–191.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.179>
- Ortega-Hernández, E., Nair, V., Welti-Chanes, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2019). Wounding and UVB light synergistically induce the biosynthesis of phenolic compounds and ascorbic acid in red prickly pears (*Opuntia ficus-indica* cv. Rojo Vigor). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms20215327>
- Paquette S, Møller BL, Bak S (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry* 62: 399–413
- Park, J. B., and Schoene, N. 2002. Synthesis and characterization of *N*-coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292:1104-1110.
- Pearce, G., Marchand, P. A., Griswold, J., Lewis, N. G., and Ryan, C. A. 1998. Accumulation of feruloyltyramine and *p*-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* 47:659-664.
- Picanço, M. C., Bacci, L., Crespo, A. L. B., Miranda, M. M. M., & Martins, J. C. (2007). Effect of integrated pest management practices on tomato production and conservation of natural enemies. *Agricultural and Forest Entomology*, 9(4), 327–335. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2007.00346.x>
- Pryor, W. A. (1997). Oxidative stress and defense mechanisms in plants: General introduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 470.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)10013-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)10013-2)
- Qi Y, Kawano N, Yamauchi Y, Ling J, Li D, Tanaka K (2005) Identification and cloning of a submergence-induced gene OsGGT (glycogenin glucosyltransferase) from rice (*Oryza sativa* L.) by suppression subtractive hybridization. *Planta* 221: 437–445
- Ramegowda, V., & Senthil-Kumar, M. (2015). The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J. Plant Physiol.* 176, 47–54.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R. M. P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., & Farmer, E. E. (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell*, 16(11), 3132–3147.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.026120>

- Reis, A., Lopes, C.A., 2006. Tomate em chamas. *Revista Cultivar Hortaliças e Frutas*. Pelotas 2, 6–8.
- Richmond, T. A., & Somerville, C. R. (2000). The cellulose synthase superfamily [2]. *Plant Physiology*, 124(2), 495–498. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.495>
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., & Jones, J. D. G. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>
- Roberts, S. C. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 387–395. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.8>
- Roh, J. S., Han, J. Y., Kim, J. H., and Hwang, J. K. 2004. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 27:1976-1978.
- Ross J, Li Y, Lim EK, Bowles DJ (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol* 2: 3004.1–3004.6
- Ross J, O’Neill D (2001) New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci* 6: 2–4
- Savatin, D. V., Gramegna, G., Modesti, V., & Cervone, F. (2014). Wounding in the plant tissue: The defense of a dangerous passage. *Frontiers in Plant Science*, 5(SEP), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00470>
- Scalschi L, Sanmartín M, Camañes G, Troncho P, Sánchez-Serrano JJ, García-Agustín P, Vicedo B. 2014. Silencing of OPR3 in tomato reveals the role of OPDA in callose deposition during the activation of defense responses against *Botrytis cinerea*. *Plant J.* 2015 Jan;81(2):304-15. doi: 10.1111/tpj.12728. Epub Dec 22.
- Scheer, J. M., & Ryan, C. A. (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9585–9590. <https://doi.org/10.1073/pnas.132266499>
- Shen, Y., Sun, T., Pan, Q., Anupol, N., Chen, H., Shi, J., Liu, F., Deqiang, D., Wang, C., Zhao, J., Yang, S., Wang, C., Liu, J., Bao, M., & Ning, G. (2019). RrMYB5- and RrMYB10-regulated flavonoid biosynthesis plays a pivotal role in feedback loop responding to wounding and oxidation in *Rosa rugosa*. *Plant Biotechnology Journal*, 17(11), 2078–2095. <https://doi.org/10.1111/pbi.13123>
- Schillmiller, A. L., & Howe, G. A. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.008>

- Schwab, C. (2008). Social relations affect social learning in ravens, *Corvus corax*, and jackdaws, *Corvus monedula*. *Zoology*, 70, 1571–1580. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.018>.
- Schmidt, A., Scheel, D., and Strack, D. 1998. Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* 205:51-55.
- Soares, N. C., Wojtkowska, J., & Jackson, P. A. (2011). A proteomic analysis of the wound response in *Medicago* leaves reveals the early activation of a ROS-sensitive signal pathway. *Journal of Proteomics*, 74(8), 1411–1420. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.03.017>
- Song JT, Koo YJ, Seo HS, Kim MC, Choi YD, Kim JH. 2008. Overexpression of AtSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*.;69(5):1128–34.
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugate it to isoleucine in Arabidopsis W inside box sign. *Plant Cell*, 16(8), 2117–2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>
- Stone BA, Clarke AE. 1992. Chemistry and Biology of (1-3)- $\beta$ -D-Glucans. Victoria, Australia: La Trobe University Press.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. Pages 387-416 in: Plant Biochemistry. P. M. Dey and J. B. Harborne, eds. Academic Press, London.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (1991) Plant physiology: Mineral nutrition. The Benjamin Cummings Publishing Co., Inc. Redwood City, 100-119.
- Tebayashi, S. I., Horibata, Y., Mikagi, E., Kashiwagi, T., Mekuria, D. B., Dekebo, A., Ishihara, A., and Kim, C. S. 2007. Induction of resistance against the leafminer, *Liriomyza trifolii*, by jasmonic acid in sweet pepper. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1521-1526.
- Thaler, J. S., Agrawal, A. A., & Rayko, H. (2010). Salicylate-mediated interactions between pathogens and herbivores. *Ecology*, 91(4), 1075–1082. <https://doi.org/10.1890/08-2347.1>
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., & Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661–665. <https://doi.org/10.1038/nature05960>
- Thomma, B. P. H. J., Penninckx, I. A. M. A., Broekaert, W. F., & Cammue, B. P. A. (2001). The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00183-7)
- Thomma B, Penninckx I, Broekaert WF, Cammue BPA (2001. a) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* 13: 63–68

- Thomma B, Tierens KFM, Penninckx I, Mauch-Mani B, Broekaert WF, Cammue BPA (2001. b) Different micro-organisms differentially induce Arabidopsis disease response pathways. *Plant Physiol Biochem* 39: 673–680
- Tu, Y., Liu, F., Guo, D., Fan, L., Zhu, Z., Xue, Y., et al. (2016). Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation. *BMC Plant Biol* 16:132. doi: 10.1186/s12870-016-0813-5
- Tornero, P., Rodrigo, I., Conejero, V., & Vera, P. (1993). Nucleotide sequence of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein, p1-p14, from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiology*, 102(1), 325. <https://doi.org/10.1104/pp.102.1.325>
- Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>
- Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). *A POMICTIC , P OLYPHAGOUS ROOT -K NOT N EMATODES : Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens.* 53–77.
- Tu Y, Liu F, Guo D, Fan L, Zhu Z, Xue Y, Gao Y, Guo M. Molecular characterization of flavanone 3-hydroxylase gene and flavonoid accumulation in two chemotyped safflower lines in response to methyl jasmonate stimulation. *BMC Plant Biol.* 2016 Jun 10;16(1):132. doi: 10.1186/s12870-016-0813-5.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., & Ryals, J. (1992). Acquired resistance in arabidopsis. *Plant Cell*, 4(6), 645–656. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.6.645>
- Van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>
- Viacava, F., Santana-Gálvez, J., Heredia-Olea, E., Pérez-Carrillo, E., Nair, V., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2020). Sequential application of postharvest wounding stress and extrusion as an innovative tool to increase the concentration of free and bound phenolics in carrots. *Food Chemistry*, 307(May 2019), 125551. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125551>
- Vicedo B., Flors V., Leyva M. O., Finiti I., Kravchuk Z., Real M. D., et al. (2009). Hexanoic acid-induced resistance against *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22
- Villegas, M., and Brodelius, P. E. 1990. Elicitor induced hydroxycinnamoyl- CoA: Tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant-cell suspensioncultures. *Physiol Plant.* 78:414-420.
- Vogt T, Jones P (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* 5: 380–386

- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- von Roepenack-Lahaye, E., Newman, M. A., Schornack, S., Hammond-Kosack, K. E., Lahaye, T., Jones, J. D. G., Daniels, M. J., and Dow, J. M. 2003. *p*-coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. *J. Biol. Chem.* 278:43373-43383.
- von Saint Paul V, Zhang W, Kanawati B, Geist B, Faus-Kessler T, Schmitt-Kopplin P, Schäffner AR (2011) The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *Plant Cell* 23: 4124–4145
- Walling, L.L., 2008. Avoiding effective defenses: strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiol.* 146 (3), 859–866.
- Walling, L. L. (2008). Avoiding effective defenses: Strategies employed by phloem-feeding insects. *Plant Physiology*, 146(3), 859–866. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113142>
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., & Miersch, O. (2006). The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology*, 163(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.10.014>
- Waterman, P. G. (1998). Chemical Taxonomy of Alkaloids. *Alkaloids*, 87–107. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2905-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2905-4_4)
- Wünsche, H., Baldwin, I. T., & Wu, J. (2011). S-Nitrosoglutathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Experimental Botany*, 62(13), 4605–4616. <https://doi.org/10.1093/jxb/err171>
- Yan, L., Zhai, Q., Wei, J., Li, S., Wang, B., Huang, T., Du, M., Sun, J., Kang, L., Li, C. B., & Li, C. (2013). Role of Tomato Lipxygenase D in Wound-Induced Jasmonate Biosynthesis and Plant Immunity to Insect Herbivores. *PLoS Genetics*, 9(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003964>
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>
- Yoshikawa, M., Luo, W., Tanaka, G., Konishi, Y., Matsuura, H., & Takahashi, K. (2018). Wounding stress induces phenylalanine ammonia lyases, leading to the accumulation of phenylpropanoids in the model liverwort *Marchantia polymorpha*. *Phytochemistry*, 155(December 2017), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.014>
- Zacarés, L., López-Gresa, M. P., Fayos, J., Primo, J., Bellés, J. M., and Conejero, V. 2007. Induction of *p*-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites,

in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:1439-1448.

- Zhang, H., Chen, L., & Nieto, J. J. (2008). A delayed epidemic model with stage-structure and pulses for pest management strategy. *Nonlinear Analysis: Real World Applications*, 9(4), 1714–1726. <https://doi.org/10.1016/j.nonrwa.2007.05.004>
- Zhang, L., Zhang, F., Melotto, M., Yao, J., & He, S. Y. (2017). Jasmonate signaling and manipulation by pathogens and insects. *Journal of Experimental Botany*, 68(6), 1371–1385. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw478>
- Zhang, W., Corwinand, 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 open. *Plant Cell*, 29(11), 2727–2752. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00348>
- Zhang, H. L., Nagatsu, A., Watanabe, T., Sakakibara, J., and Okuyama, H. 1997. Antioxidative compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) oil cake. *Chem. Pharm. Bull.* 45:1910-1914.