



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Estudio del papel de THT y TWI1 en la alteración del
volatiloma de plantas de tomate en respuesta al daño
mecánico por herida

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Andrade Cardenas, Cynthia Estefania

Tutor/a: Vera Sirera, Francisco José

Cotutor/a: López Gresa, María Pilar

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**INSTITUTO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA
AGRODIVERSIDAD VALENCIANA**

MÁSTER UNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL



TRABAJO FINAL DE MÁSTER

**Estudio del papel de *THT* y *TWI1* en la alteración del volatilo
de plantas de tomate en respuesta al daño mecánico por herida**

Curso **2022-2024**

Realizado por:

Cynthia Estefanía Andrade Cárdenas

Directores:

**María Pilar López Gresa
Francisco José Vera Sirera**

Valencia, Julio 2024

Estudio del papel de *THT* y *TWI1* en la alteración del volatiloma de plantas de tomate en respuesta al daño mecánico por herida

ABSTRACT

In response to stress situations, such as injury, plants trigger the release of a series of Volatile Organic Compounds (VOCs), which play a fundamental role in their own defense and that of neighboring plants. It has been described that *THT* and *TWI1* genes, involved in the metabolism of hydroxycinnamic acid amides (HCAAs) and flavonoids, respectively are induced in stress situations such as wounding, although their specific role has not yet been studied in detail.

The last stage of HCAA biosynthesis is catalyzed by the enzyme tyramine hydroxycinnamoyl transferase (THT) (Zacarés et al., 2007). On the other hand, most flavonoids tend to accumulate in the form of glycoconjugates, by the action of glycosyltransferases. Glycosyltransferase *TWI1* shows in vitro activity against the flavonoids quercetin and kaempferol. Both THT and *TWI1* are involved in plant defensive mechanisms against pathogens, as tomato plants overexpressing THT (*35S: THT*) are more resistant to the bacterium *Pseudomonas syringae* (Campos et al., 2014), whereas tomato plants silencing *TWI1* (*RNAi_Twi1*) are more susceptible to tomato spotted wilt virus (Campos et al., 2019).

To study the possible role of *TWI1* and *THT* in interplant communication upon induction of mechanical wound damage, a metabolomic study was carried out to identify the VOCs differentially emitted by *RNAi_Twi1* and *35S: THT* transgenic tomato plants. The results obtained suggest that *TWI1* transgenic plants partially suppress the wound response by altering VOC emission, suggesting that glycosylation of secondary metabolites is a key step in the wound response. On the other hand, *THT* plants in addition to emitting volatiles commonly described in response to wounding (aldehydes and C5 and C6 alcohols), also presented a higher concentration of long-chain aldehyde compounds (C7-C10) such as 2-heptenal, E-E-2,4-heptadienal, 2H-Pyran-2.6(3H)-dione ; 2-Pentyl-furan; E-2-Octenal, E-2-Decenal.

In addition, overexpression of *THT* leads to increased callose accumulation in the wounded area. This accumulation is related to the higher concentration of hydroxycinnamoyl-CoA thioesters (HCAAs) in *35S: THT* plants, key components in cell wall reinforcement.

RESUMEN

En respuesta a situaciones de estrés, como una herida, las plantas desencadenan la liberación de una serie de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs), que desempeñan un papel fundamental en su propia defensa y en la de las plantas vecinas. Se ha descrito que los genes *THT* y *TWI1*, implicados en el metabolismo de las amidas de los ácidos hidroxinámicos (HCAAs) y los flavonoides, respectivamente se inducen en situaciones de estrés como una herida, aunque su papel específico aún no se ha estudiado detalladamente.

La última etapa de la biosíntesis de las HCAAs está catalizada por la enzima tiramina hidroxicinamoil transferasa (THT) (Zacarés et al., 2007). Por otra parte, la mayoría de los flavonoides suelen acumularse en forma de glicoconjugados, por acción de las glicosiltransferasas. En particular, la glicosiltransferasa *TWI1* muestra actividad *in vitro* frente a los flavonoides quercetina y kaempferol. Tanto *THT* como *TWI1* están implicados en los mecanismos defensivos de las plantas frente a patógenos, ya que las plantas de tomate que sobre expresan *THT* (*35S: THT*) son más resistentes a la bacteria *Pseudomonas syringae* (Campos et al., 2014), mientras que las plantas de tomate que silencian *TWI1* (*RNAi_Twi1*) son más susceptibles al virus del marchitamiento manchado del tomate (Campos et al., 2019).

Con el fin de estudiar el posible papel de *TWI1* y *THT* en la comunicación *inter-planta* al inducir un daño mecánico por herida, se llevó a cabo un estudio metabolómico para identificar los VOCs emitidos diferencialmente por las plantas de tomate transgénicas *RNAi_Twi1* y *35S: THT*. Los resultados obtenidos, sugieren que las plantas transgénicas *TWI1* suprimen parcialmente la respuesta a herida alterando la emisión de VOCs, sugiriendo que la glicosilación de los metabolitos secundarios parece ser un paso clave en la respuesta a la herida. Por otro lado, las plantas *THT* además de emitir volátiles comúnmente descritos en respuesta a una herida (aldehídos y alcoholes C5 y C6), también presentaron una mayor concentración de compuestos aldehídos de cadena larga (C7-C10) como el 2-heptenal, *E-E*-2,4-heptadienal, 2H-Piran-2.6(3H)-diona 2-Pentil-furano; *E*-2-Octenal, *E*-2-Decenal.

Además, la sobreexpresión de *THT* conduce a una mayor acumulación de callosa en la zona herida. Esta acumulación está relacionada con la mayor concentración de hidroxicinamoil-CoA tioésteres (HCAAs) en las plantas *35S: THT*, componentes clave en el refuerzo de la pared celular.

Key words: Volatile organic compounds (VOCs), wound, *THT*, *TWI1*, callose.

Palabras clave: Compuestos orgánicos volátiles (VOCs), herida, *THT*, *TWI1*, callosa.

Autor:

Cynthia Estefanía Andrade Cárdenas

Directores:

María Pilar López Gresa

Francisco José Vera Sirera

Valencia, Julio 2024.

AGRADECIMIENTOS

Queridos padres, Betty y Ángel,

Con todo mi corazón, quiero expresarles mi más sincero y profundo agradecimiento por el apoyo incondicional que me han brindado. Gracias por impulsarme a cruzar el océano para continuar con mis estudios. Sin su esfuerzo, amor y constante aliento, no habría podido lograrlo. Ustedes son la brújula que me ha guiado en este camino. Cada palabra de ánimo y cada sacrificio que han hecho por mí ha sido esencial para alcanzar este logro. Les debo todo lo que soy y todo lo que he conseguido. Gracias por creer en mí siempre y por estar a mi lado en cada paso de este camino.

Quisiera expresar mi especial gratitud a Puri, quien, a pesar de no conocerme, gentilmente me abrió las puertas de su laboratorio. Gracias a ella, tuve la oportunidad de conocer a personas extraordinarias como Mapi, Paco, Ismael y José María. No solo contribuyeron de manera invaluable a la realización de mi Trabajo Final de Máster, sino que también me brindaron apoyo y motivación cada día. La calidad humana que representan es admirable y siempre los llevare en mi corazón

A mis queridos compañeros del laboratorio: Julia, Carmen, Fran, Eneritz, Marc, Sara, Silvia y Miguel. Muchísimas gracias por acogerme con los brazos abiertos y por hacer de cada día en el laboratorio una experiencia inolvidable.

Se ha dicho que migrar es un camino lleno de retos y desafíos, pero gracias a todas las personas maravillosas que se han cruzado en mi camino, esta experiencia se ha convertido en una gran aventura llena de aprendizajes, risas y momentos enriquecedores. Quisiera extender mi agradecimiento a todas aquellas personas que, por un motivo u otro, no he podido mencionar aquí. Sepan que su apoyo y cariño han sido igual de importantes para mí.

A todos ustedes, les estaré eternamente agradecida por su apoyo. Este capítulo de mi vida quedará grabado para siempre en mi memoria.

Con todo mi cariño y gratitud,

Cynthia

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Cultivo de Tomate	1
1.2	Mecanismos de defensa de las plantas	2
1.3	Metabolismo secundario en el sistema defensivo	2
1.4	Modificación de los metabolitos secundarios	3
1.5	Emisión de Compuestos orgánicos volátiles	6
1.6	Respuesta inducida por Herida	7
1.7	Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y la síntesis de volátiles de hoja verde	9
2	OBJETIVOS	11
3	MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1	Material vegetal y condiciones de cultivo	12
3.2	Herida y toma de muestras	12
3.3	Análisis de compuestos orgánicos volátiles mediante cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	13
3.4	Tinción de callosa con azul de Anilina en hojas de <i>S lycopersicum</i>	15
3.5	Análisis estadístico	15
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1	Análisis de VOCs de plantas transgénicas <i>RNAi_Twi1</i> y su parental silvestre en respuesta a herida	16
4.2	Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a herida en plantas de tomate <i>Twi1_28.3</i>	20
4.3	Análisis de callosa en plantas <i>RNAi_Twi1</i> y su parental silvestre en respuesta a herida	22
4.4	Análisis de VOCs de plantas transgénicas <i>35S: THT</i> y su parental silvestre en respuesta a herida	24
4.5	Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a herida en plantas de tomate <i>35S: THT</i>	29
4.6	Análisis de fluorescencia de callosa en respuesta a herida en plantas de tomate <i>35S: THT</i>	30
5	CONCLUSIONES	34
6	BIBLIOGRA	35

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Ruta biosintética de flavonoides y ácidos hidrocinámicos.** La enzima THT(Hidroxycinnamoil-trnsferasa) es responsable de la síntesis de HCAAs (Amidas derivadas del ácido hidroxicinámico) a partir de tiramina y p-coumaroil-CoA. PAL (Fenilalanina), LOX (Lipooxigenasas), JA (Ácido Jasmónico), GLVs (Green Leaf volátiles). Elaboración propia empleando Biorender----- 6
- Figura 2 Árbol Biosintético de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).** En la rama (A), se presenta la ruta de los terpenos producidos por la vía MEP en el cloroplasto, que produce isopreno a partir de DMAPP, así como monoterpenos y diterpenos. Estos últimos sirven como precursores del homoterpeno TMTT y el apocarotenoide β -ionona. En la rama (B), los sesquiterpenoides se forman a partir del farnesil difosfato FPP, derivado de la vía citosólica del ácido mevalónico MVA. Los ácidos grasos en la rama (C) siguen la ruta de las oxilipinas, que se fragmentan en derivados de GLV y JA. A partir del corismato se generan los indoles volátiles a partir del antranilato (rama D) y los bencenoides a partir de la fenilalanina (Phe; rama E) y el isocrismato (rama F), Figura tomada de (Maffei, 2010)----- 7
- Figura 3 Modelo de acción de la sistemina en la producción de ácido jasmónico (JA) y volátiles de hoja verde (GLVs).** La sistemina se origina a partir de prosistemina y tras la unión al receptor quinasa libera el ácido linoleico, sustrato de las lipoxigenasas (LOX) para dar lugar al JA y GLVs Elaboración propia empleando Biorender ----- 8
- Figura 4. Ruta de las oxilipinas o lipoxigenasas LOX.** Los PUFAs, se descomponen en ácido linoleico y linolénico por acción de LIP1. Posteriormente diferentes enzimas presentes en el diagrama (color rojo) actúan sobre los sustratos para formar diferentes compuestos volátiles C5, C6, así como el ácido jasmónico. La representación de varias flechas seguidas indica que hay diferentes reacciones enzimáticas. LIP1, lipasa1; LOX, lipoxigenasa; HPL, hidroperóxido liasa, HPO, hidroperóxidos; AOS, óxido de aleno sintasa; AOC, óxido de aleno ciclasa; 12-OPDA, 12-oxo-fitodienoico (Elaboración propia empleando BioRender). ----- 10
- Figura 5. Foliolos de tomate tras realizar una herida mecánica**----- 13
- Figura 6 Score plot del análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos orgánicos volátiles basado en la abundancia de las señales de los espectros de masas dentro de un rango m/z de 35 a 250, correspondiente a hojas de plantas de tomate RNAi_Twi1 y WT, heridas (H) o sin herir.** Los colores indican los diferentes genotipos y tratamientos: Rojo: RNAi_Twi1 Mock; Verde: RNAi_Twi1, Herida; Morado: WT, Mock; Celeste: WT, Herida----- 17
- Figura 7 Loding plot condensado correspondiente a hojas de plantas de tomate WT y RNAi_Twi1 heridas.** En azul se indican GLVs identificados a partir de los iones diferenciales de plantas WT heridas----- 18
- Figura 8 Emisión de GLVs de hojas de tomate WT (WT-Twi1) ante una herida mecánica.** (A) Emisión de Z-3-Hexenal; (B) Emisión Butanoato de Z-3-Hexenilo; (C) Emisión de 1-Penten-3-one; (D) Emisión de Z-2-Penten-1-ol; Cuantificación relativa del área del pico del cromatograma en el tiempo de retención correspondiente a los compuestos orgánicos volátiles descritos anteriormente, de plantas heridas (Wound) y plantas sin herir (Mock). Las letras muestran la información de agrupación utilizando el método de Two way Anova con un nivel de significancia del 5%(p-value<0,05). ----- 19

Figura 9 Expresión relativa de los genes *LIP1*, *TomLoxC* y *TCI21* y en hojas de plantas transgénicas *RNAi_Twi1* y su parental *Money Maker (WT_Twi1)* después de 24 horas de la herida (*Wound*) y sin herir (*Mock*) A Expresión relativa del gen *LIP1*; B Expresión relativa del gen *TomLoxC*; C Expresión relativa del gen *TCI 21*. La expresión de mRNA en hojas de tomate para estos genes se analizó mediante qRT-PCR, utilizando el gen de la actina como referencia para normalizar los datos. Los controles no heridos (*WT_Twi1 Mock*) se tomaron como valor de referencia. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas biológicas del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test ANOVA con un valor *p* menor de 0.05 entre las distintas variedades de tomate. ----- 21

Figura 10 Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de la línea *RNAi_Twi1* y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. Las letras indican las muestras (A) *WT Replica 1*; (B) *RNAi_Twi1 Replica 1*; (C) *WT Replica 2*; (D) *RNAi_Twi1 Replica 2*. ----- 23

Figura 11 Cuantificación de la Fluorescencia de callosa con ImageJ de hoja de tomate de la línea *RNAi_Twi1* y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. Las letras indican las muestras (A) *WT Replica 1*; (B) *RNAi_Twi1 Replica 1*; (C) *WT Replica 2*; (D) *RNAi_Twi1 Replica 2*; (E) Cuantificación de fluorescencia de callosa en dos hojas de cada línea. ----- 23

Figura 12 Score plot del PCA basado en la abundancia de las señales de los espectros de masas dentro de un rango *m/z* de 35 a 250, correspondiente a hojas de plantas de tomate 35S: *THT (THT_7.3)* y *WT (WT_THT)*, heridas (*H*) o ilesas. Los colores indican los diferentes genotipos y tratamientos: Rojo: *THT 7.3 Mock*; Verde: *THT 7.3, Herida*; Morado: *WT,Mock*; Celeste: *WT,Herida*----- 25

Figura 13 Loding plot del PCA correspondiente a hojas de plantas de tomate 35S: *THT* y *WT* heridas. En color se indican los VOCs identificados a partir de los iones diferenciales de plantas 35S: *THT* heridas (verde) *WT* (azul) tras 24 horas después de ser heridas. ----- 26

Figura 14 Emisión de GLVs de hojas de tomate *WT (WT-THT)* ante una herida mecánica. Emisión de (A) *Z-3-Hexenal*; (B) *2-4-Hexadienal*; (C) *Z-3-Hexenyl Butyrate*; (D) *1-Penten-3-one*. Cuantificación relativa del área del pico del cromatograma en el tiempo de retención correspondiente a los compuestos orgánicos volátiles descritos anteriormente, de plantas de plantas Heridas (*Wound*) y plantas sin herir (*Mock*). Las letras muestran la información de agrupación utilizando el método de Two way Anova con un nivel de significancia del 5% (*p-value*<0,05) ----- 27

Figura 15 Emisión de VOCs de hojas de tomate 35S: *THT (THT_7_3)* ante una herida mecánica. Emisión de (A) *2-Heptenal*, (B) *(E, E)-2,4-Heptadienal*, (C) *2H-Piran-2.6(3H)-diona*, (D) *2-pentilfurano*, (E) *E-2-Octenal*; (F) *E-2-Decenal*. Cuantificación relativa del área del pico del cromatograma en el tiempo de retención correspondiente a los compuestos orgánicos volátiles descritos anteriormente, de plantas de plantas Heridas (*Wound*) y plantas sin herir (*Mock*). Las letras muestran la información de agrupación utilizando el método de Two way Anova con un nivel de significancia del 5% (*p-value*<0,05) ----- 28

Figura 16 Expresión relativa de los genes *LIP1*, *TCI21* y *TomLoxC* en hojas de plantas transgénicas 35S: *THT(THT_7.3)* y su parental silvestre (*WT_THT*) después de 24 horas de la herida (*Wound*) y sin herir (*Mock*). Expresión relativa del gen A) *LIP1*, B) *TCI21* y C) *TomLoxC*. La expresión de mRNA en hojas de tomate para estos genes se analizó mediante qRT-PCR, utilizando el gen de la actina como referencia para

normalizar los datos. Los controles no heridos (WT_THT Mock) se tomaron como valor de referencia. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test ANOVA con un valor p menor de 0.05 entre las distintas variedades de tomate. ----- 30

Figura 17 Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de la línea THT_7_3 y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. Las letras indican las muestras (A) WT- Réplica 1; (B) 35S: THT Réplica 1; (C) WT- Réplica 2; (D) 35S: THT Réplica 1 ----- 31

Figura 18 Fluorescencia de callosa teñida con azul de anilina, medida con ImageJ de hoja de tomate de la línea THT_7_3 y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. (A) WT-R1; (B) THT_7_3-R1; (C) WT-R2; (D) THT_7_3-R2; (E) Cuantificación fluorescencia de callosa en dos hojas de cada línea. ----- 32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 *Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la medición de expresión génica mediante la realización de qPCR.* 15

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de la varianza
AGL: ácidos grasos libres
AOC: óxido de aleno ciclasa
AOS: óxido de aleno sintasa
Avr: Avirulentas
CaMV: *Cauliflower mosaic virus*
CEVd: viroide *Citrus exocortis*
CT: coumaroiltiramina
DXP: desoxixilulosa-5-fosfato
GA: ácido gentísico
GC-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
GLVs: Volátiles de hoja verde
FA-VOC: compuestos orgánicos volátiles derivados de ácidos grasos
FT: feruloiltiramina
HPL: Hidroperóxido liasa
HPO: hidroperoxido
HCAA: ácido hidroxicinámico
HR: Respuesta hipersensible
ISR: resistencia sistémica inducida
JA: Ácido jasmónico
LOX: Lipoxigenasa
LIP1: Lipasa de clase III
MEP: Metileritritol fosfato
MM: MoneyMaker
MVA: mevalonato
NT: No tratada
OPDA: ácido 12-oxo-fitodienoico
PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos
PAL: fenilalanina amoníaco-liasa
PIN: Inhibidores de proteinasas
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones
PR: proteínas antimicrobianas
Pst: *Pseudomonas syringae* pv. tomato
PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados
R: Genes de resistencia
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
SA: Ácido salicílico
SAR: resistencia sistémica adquirida
UDPG: uridina difosfato-glucosa
UGT: glicosiltransferasas dependientes de azúcar
VOCs: Compuestos orgánicos volátiles
ToMV: *virus del mosaico del tomate*
TCI21: Inhibidor 21 de quimotripsina
WT: Wild type

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de Tomate

Según datos de 2022 de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO), la producción mundial de tomate alcanzó los 186 millones de toneladas en una superficie de siembra de 4 millones de hectáreas. China es la región líder en la producción de tomates, con una producción de 68241,81 millones de kilos, seguido por India, Turquía y Estados Unidos. A nivel europeo, España destaca como el principal productor, ocupando el décimo lugar a nivel mundial con una producción total de 3651,94 millones de kilos de tomate (FAOSTAT, 2022).

Origen, Taxonomía y descripción botánica.

El tomate, cuyo nombre científico es *Solanum lycopersicum* L., es una planta diploide ($2n=2x=24$) y pertenece a la familia de las Solanáceas. En esta familia se encuentran otras especies cultivadas como la patata, el pimiento o la berenjena (Peralta et al., 2000).

Esta especie tiene como centro de origen la región andina de América del Sur, extendiéndose desde el centro de Ecuador, pasando por Perú, hasta el norte de Chile y las Islas Galápagos (Peralta et al., 2000). El tomate es un cultivo transdomesticado, lo que significa que ha sido domesticado en un lugar diferente a su área de origen. Todo parece indicar que esta domesticación ocurrió en México a través del intercambio de semillas entre los nativos de la región (Esquinas-Alcázar & Nuez, 1995).

Es una planta anual de tipo arbustivo; morfológicamente, puede ser de tipo rastrero, semi erecta o erecta. Según su hábito de crecimiento, puede ser de tipo indeterminado, manteniendo la dominancia de una yema vegetativa en el ápice de las ramas, o determinado, donde eventualmente se desarrolla una inflorescencia terminal en el ápice de las ramas (J. Fornaris, 2007). Su sistema radicular está formado por una raíz pivotante central que puede alcanzar una profundidad de 60 cm, junto con numerosas raíces laterales y secundarias. Las hojas son compuestas y se insertan alternadamente en los nudos, con un limbo que puede tener de siete a once folíolos. La flor es perfecta, regular e hipógina, con 5 o más sépalos y un número igual de pétalos. Los frutos son bayas carnosas que varían en forma, diámetro y color. En su etapa inmadura, los frutos son verdes y peludos y al madurar, suelen ser rojos, escarlata, amarillos o anaranjados (J. Fornaris, 2007; Fonseca Vasco & Sans, 2015; Saavedra et al., 2019; Ouattara & Konate, 2024).

El tomate es uno de los principales modelos en la investigación vegetal debido a su importancia económica, así como sus características biológicas relacionadas con la fisiología de la planta y su genética. Algunas de las características biológicas del tomate que contribuyen a su importancia en el ámbito científico incluyen su naturaleza autógama, su ciclo de vida breve, su capacidad para adaptarse a diversos suelos y condiciones ambientales, su insensibilidad al fotoperíodo que le permite florecer y producir semillas en ciclos tanto largos como cortos de luz, y su facilidad para la polinización controlada y la generación de híbridos (Samuel et al., 2021).

1.2 Mecanismos de defensa de las plantas

Las plantas, siendo el grupo autotrófico más grande e importante en la Tierra, sirven como fuente de nutrición para todos los organismos heterotróficos, como animales, insectos y microbios. Sin embargo, se enfrentan a numerosos patógenos que pueden dañarlas. Para protegerse, las plantas han desarrollado complejos mecanismos de defensa (Mahawer et al., 2022).

Las defensas activas de las plantas se organizan en dos principales sistemas inmunitarios. El primer nivel de reconocimiento, conocido como inmunidad activada por patógenos (PTI) consiste en receptores de reconocimiento de patrones (PRR) en la membrana celular, los cuales detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como la flagelina en bacterias y la quitina en hongos (Monaghan & Zipfel, 2012). Este reconocimiento conduce a la activación de una respuesta de defensa que se caracteriza por la acumulación de callosa, refuerzo de la pared celular y la activación de la expresión de genes de defensa. El segundo sistema de reconocimiento incluye genes de resistencia que producen proteínas R, las cuales detectan proteínas avirulentas (Avr) o efectores de los patógenos, desencadenando la inmunidad activada por efectores (ETI) (Dangl & McDowell, 2006; Gouveia et al., 2017).

Tras este primer nivel de reconocimiento se activan diversos mecanismos defensivos, como la respuesta hipersensible (HR) que provoca el rápido colapso de las células huésped atacadas aislándose al patógeno durante el inicio de la infección, provocando la síntesis de fitoalexinas antimicrobianas y de enzimas que degradan las paredes celulares de los patógenos y un engrosamiento de la pared celular para establecer una barrera física (Voigt, 2014).

En plantas se han caracterizado varios tipos de resistencia inducible sistémica: (i) la resistencia sistémica adquirida (Systemic Acquired Resistance, SAR), que se activa tras la infección de las plantas por patógenos que producen necrosis como virus, bacterias u hongos, y como consecuencia se acumula la fitohormona ácido salicílico (SA) y proteínas defensivas PR (Fu & Dong, 2013); (ii) la resistencia sistémica inducida (Induced Systemic Resistance, ISR), que es activada tras la colonización de las raíces por determinadas cepas bacterianas de la rizosfera y dependiente de etileno y ácido jasmónico (JA); (iii) la resistencia inducida por herida (Wound Induced Resistance, WIR), provocada por las heridas que causan en el tejido vegetal los herbívoros y el daño mecánico (Kessler y Baldwin, 2002).

Como resultado, la planta queda protegida de infecciones secundarias por un periodo de varias semanas a meses.

Otro mecanismo de defensa empleado por las plantas es el conocido como estallido oxidativo, el cual induce la expresión de genes de defensa y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que eliminan a los patógenos en el sitio de infección (Mahawer et al., 2022).

1.3 Metabolismo secundario en el sistema defensivo

Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por la planta permitiéndolas ser competitivas en su entorno. Estas pequeñas moléculas tienen una amplia gama de efectos, tanto en la propia planta como en otros organismos; contribuyen al color de las plantas, a fragancias, a sabores específicos, y tienen un papel

fundamental en la respuesta a diversos tipos de estrés tanto bióticos como abióticos (Teoh, 2016; Reshi et al., 2023).

Las plantas, producen tres grupos principales de metabolitos secundarios según su estructura química. Entre estos grupos se encuentran los terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (Reshi et al., 2023).

Los **terpenos**, también conocidos como terpenoides o isoprenoides son la familia de metabolitos secundarios más abundantes en la naturaleza (Pott et al., 2019). Actualmente se conocen aproximadamente 55.000 estructuras que se clasifican de acuerdo con el número de unidades de isopreno que los conforman (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y carotenoides). Han tenido un gran interés comercial debido a sus importantes roles como agentes antimicrobianos, insecticidas y en el control de malas hierbas. Además, atraen insectos beneficiosos, como polinizadores y dispersores de semillas, así como a enemigos naturales de plagas (Ninkuu et al., 2021).

Los **compuestos fenólicos**, son metabolitos que participan en múltiples aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como en sus respuestas a estímulos ambientales. Estos compuestos se sintetizan a partir de intermediarios de la ruta del ácido shikímico y se modifican estructuralmente mediante la acción combinada de liasas, transferasas, ligasas, reductasas y oxigenasas (Vogt, 2010). Los polímeros a base de fenilpropanoides, como la lignina, la suberina o los taninos, contribuyen sustancialmente a la estabilidad y robustez de las plantas, ayudándolas a resistir frente a daños mecánicos o ambientales, como la sequía o heridas (Cesarino et al., 2022). Estos compuestos se clasifican de acuerdo con su esqueleto carbonado en fenólicos simples (C6), estilbenos (C6-C2), fenilpropanoides (C6-C3) y flavonoides (C6-C3-C6) (Zacares et al., 2008).

Los **alcaloides**, son metabolitos especializados de origen natural que contiene uno o más átomos de nitrógeno, generalmente ubicados en un anillo heterocíclico (Bhambhani et al., 2021). Al igual que las proteínas, derivan de aminoácidos, pero se diferencian por su naturaleza alcalina (Teoh, 2016). Tradicionalmente estos compuestos se han utilizado como extractos de plantas por sus actividad terapéutica y psicoactiva (Bhambhani et al., 2021).

1.4 Modificación de los metabolitos secundarios

A la diversidad de rutas metabólicas involucradas en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario de las plantas, se suman modificaciones adicionales como la conjugación, hidroxilación, metilación y acilación, las cuales incrementan la variedad de estos metabolitos (Gachon et al., 2005; Martín et al., 2021).

Conjugación de ácidos hidrocinnámicos con aminas biogénicas. THT-Hidroxycinnamoil-trnsferasa.

En las áreas donde ocurre una herida, las células pueden experimentar daños significativos, lo que conlleva a una muerte celular programada de algunas filas celulares adyacentes a las células rotas, lo que da como resultado el cierre físico de la herida (Cui et al., 2013). Esto se combina con la deposición local de lignina, callosa y compuestos fenólicos, ayudando a prevenir la pérdida de agua y la entrada de patógenos (Savatin et al., 2014)

Las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAA), son un conjunto de metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los fenilpropanoides que presentan un bajo peso molecular (Muroi et al., 2009), e intervienen en una gran variedad de procesos de crecimiento y desarrollo, por ejemplo, está relacionada con la inducción floral, la formación de flores, la diferenciación sexual, la tuberización y la división celular (Facchini et al., 2002).

Dentro del grupo de los fenilpropanoides, las HCAA se han descrito en todo el reino vegetal y su presencia ha sido asociada a áreas infectadas o heridas, debido a sus elevadas concentraciones en órganos lesionados (Liu et al., 2022). Por ejemplo, 24 horas después de la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) y *Erwinia carotovora carotovora*, el contenido de HCAA en las hojas de *Arabidopsis thaliana* aumentó significativamente. Además, la aplicación exógena de HCAA aumentó la deposición de callosa (Macoy et al., 2022). Los HCAA también influyen en el contenido de lignina. Por ejemplo, cuando se aplican exógenamente, los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico provocan una sobreproducción de lignina y sus principales monómeros (Lima et al., 2013).

Estos compuestos se forman mediante la condensación de tioésteres de hidroxicinamoil-CoA con feniletilaminas como la tiramina o poliaminas como la putrescina, catalizada por la enzima THT. La *THT*, homóloga a ciertas acetiltransferasas de mamíferos y microorganismos, ha sido aislada de diversas plantas y sus ADNc clonados en especies como patata, tabaco y pimiento (Facchini et al., 2002).

En nuestro laboratorio se observó que la infección de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* induce la expresión de *THT* y la acumulación de HCAA (Zacarés et al., 2007; López Gresa et al., 2011). Se generaron plantas transgénicas de tomate de la variedad Money Maker que sobre expresan el gen *THT* utilizando el promotor constitutivo 35S de *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Estas plantas presentaron una mayor acumulación constitutiva de coumaroiltiramina (CT) y feruloiltiramina (FT) en hojas, flores y frutos. Además, la infección de estas plantas transgénicas con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* provocó una mayor acumulación no solo de CT y FT, sino también de las amidas derivadas de la octopamina y de la noradrenalina. Esta acumulación estuvo acompañada de una mayor síntesis de ácido salicílico (SA), una mayor inducción de genes PR y una consiguiente mayor resistencia a la bacteria (Campos et al., 2014).

La acumulación de HCAA desempeña un doble papel en la defensa de la planta. Por un lado, refuerzan físicamente la pared celular, haciéndola más resistente (Clarke, 1982; Negrel y Lherminier, 1987), y por otro, actúan 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). Además de estudiar la respuesta de estas plantas (35S: *THT*) frente a estrés biótico, hemos analizado su respuesta frente al daño mecánico por herida. Resultados previos indican que *THT* induce en menor medida los genes que responden a herida debido al engrosamiento de su pared celular que provoca la deposición de las amidas (Martín et al., 2021).

Glicosilación de compuestos fenólicos. Twi1-Tomato Wound-induced Glicosiltransferasa.

La glicosilación, o conjugación con una molécula de azúcar, es una de las modificaciones más comunes en la regulación de metabolitos secundarios y es realizada por enzimas llamadas glicosiltransferasas dependientes de azúcar (UGT) que transfieren el grupo de azúcar activo de azúcares nucleotídicos, generalmente uridina difosfato-glucosa (UDPG), a diversos receptores de moléculas pequeñas en las plantas. Estos receptores incluyen hormonas, metabolitos secundarios, productos de infestaciones de patógenos, y sustancias tóxicas tanto internas como externas (Zhang et al., 2024).

La glicosilación de pequeñas moléculas vegetales por las UGT desempeña un papel crucial en la regulación de la actividad de las moléculas señal (Zhang et al., 2022). Por ejemplo, varias UGT están estrechamente relacionadas con la respuesta a herida y la resistencia a enfermedades. Las UGT73B3 y UGT73B5 son esenciales para la resistencia a *Pseudomonas syringae* pv tomate (Pst) en *A. thaliana* (Langlois-Meurinne et al., 2005). La sobreexpresión UGT76B1 promueve la respuesta de JA y retrasa la senescencia, mientras que la pérdida de función de UGT76B1 conduce a una mayor resistencia al patógeno biotrófico *Pseudomonas syringae* y a una senescencia acelerada, aunque aumenta la susceptibilidad a la necrotrófica *Alternaria brassicicola* (von Saint Paul et al., 2011).

En tomate, se han identificado algunas UGT relacionadas con estreses bióticos y abióticos. Por ejemplo, *GAGT* es una glicosiltransferasa del ácido gentsílico (GA) que se induce en el tomate después de la infección por el viroide *Citrus exocortis* (CEVd) y el virus del mosaico del tomate (ToMV), sugiriendo que esta enzima regula los niveles de GA libre en interacciones compatibles entre plantas y patógenos (Tárraga et al., 2010). También se ha observado que otra glicosiltransferasa *Twi 1* de *S. lycopersicum* se induce al realizar una herida en las hojas, al aplicar SA exógeno y en respuesta a elicitores fúngicos (O'Donnell et al., 1998).

En nuestro laboratorio, se crearon plantas transgénicas de tomate de la variedad Money Maker con el gen *Twi 1* silenciado mediante *RNAi*, resultando más susceptibles al virus del bronceado del tomate *TSWV* que su fondo genético. Se ha asociado su expresión a una respuesta de defensa. Estudios bioquímicos *in vitro* e *in vivo* confirmaron que es una glicosiltransferasa que utiliza glucosa UDP como donante de azúcar y compuestos fenólicos simples, cumarinas y flavonoides como aceptores de azúcar (Campos et al., 2019). Asimismo, las plantas transgénicas *RNAi_Twi1* mostraron una mayor inducción de los genes de herida, sugiriendo que la glicosilación de los sustratos de *Twi 1*, podría reprimir esta respuesta (Martín et al., 2021).

En nuestro laboratorio, además de profundizar la respuesta defensiva de estas plantas (35S: *THT* y *RNAi_Twi1*) frente a estrés biótico, también estudiamos su respuesta frente al daño mecánico por herida. Contamos con plantas transgénicas (Figura1) que sobre expresan el gen *THT* (35S: *THT*) o que silencian el gen *Twi1* (*RNAi_Twi1*), presentando niveles alterados de HCAAs y flavonoides, respectivamente (Campos et al., 2019).

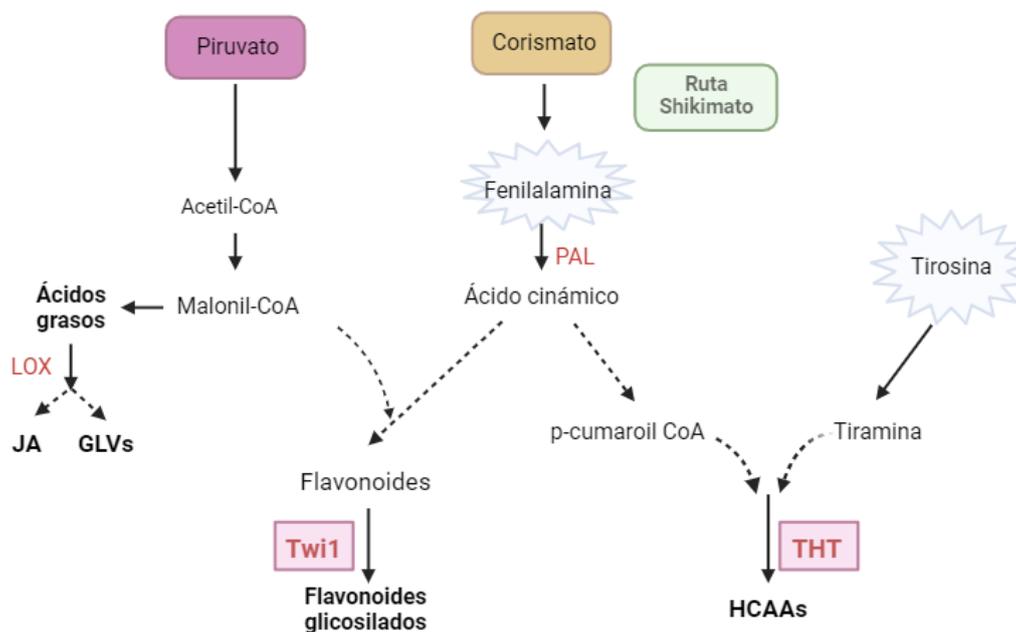


Figura 1 Ruta biosintética de flavonoides y ácidos hidrocinnámicos. La enzima THT (Hidroxycinnamoil-trnsferasa) es responsable de la síntesis de HCAAs (Amidas derivadas del ácido hidroxicinnámico) a partir de tiramina y p-coumaroil-CoA. PAL (Fenilalanina), LOX (Lipooxigenasas), JA (Ácido Jasmónico), GLVs (Green Leaf volátiles). Elaboración propia empleando Biorender

1.5 Emisión de Compuestos orgánicos volátiles.

La emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) permiten a las plantas mantener un constante dialogo con los organismos de su entorno, cumpliendo diversas funciones ecológicas. Estas funciones incluyen la defensa indirecta contra insectos, la atracción de polinizadores, la comunicación entre plantas, la tolerancia al estrés ambiental, así como la defensa frente a depredadores (Vivaldo et al., 2017).

Químicamente, los VOCs son metabolitos secundarios de bajo peso molecular que pertenecen a un amplio grupo de compuestos, como terpenoides, benzenoides, y moléculas derivadas de ácidos grasos, incluyendo los volátiles de hoja verde (GLVs) (Bouwmeester et al., 2019), el ácido jasmónico (JA) y el jasmonato de metilo (MeJA) (Maffei, 2010; Nawrocka et al., 2023). Estos compuestos se producen en diversos órganos de la planta (hojas, flores, frutos y raíces) y se almacenan en estructuras secretoras especializadas, tales como tricomas glandulares y conductos de resina. Aunque las plantas los liberan de forma espontánea, su emisión puede variar según las condiciones de estrés específicas (Cagliero et al., 2021).

Su síntesis esta mediada por varias rutas bioquímicas (Figura2). Por ejemplo, los isoprenoides se generan mediante la vía de la desoxixilulosa-5-fosfato (DXP) (Chatzivasileiou et al., 2019) también conocida como vía MEP en los cloroplastos y por la vía del mevalonato (MVA) en el citoplasma (Maffei, 2010); los GLVs se originan a partir de los ácidos grasos poliinsaturados C18, como el ácido linoleico y linoléico (Bouwmeester et al., 2019), que se liberan de la membrana del cloroplasto mediante la actividad de las lipoxigenasas, en la ruta conocida como vía (LOX) (Viswanath et al., 2020; Maffei, 2010). Los benzenoides provienen del corismato a través de la vía del Shikimato (Maffei, 2010).

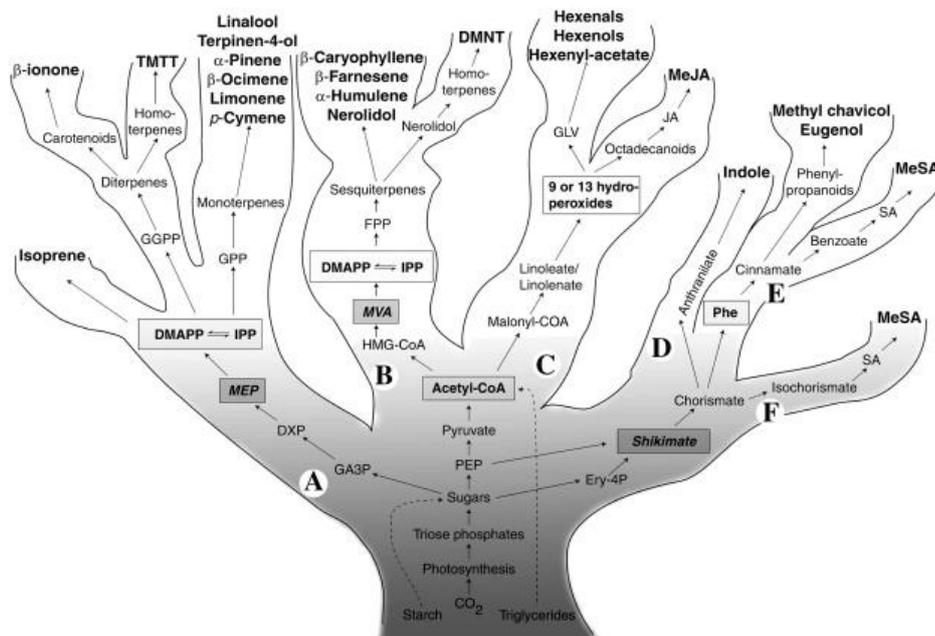


Figura 2 *Árbol Biosintético de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).* En la rama (A), se presenta la ruta de los terpenos producidos por la vía MEP en el cloroplasto, que produce isopreno a partir de DMAPP, así como monoterpenos y diterpenos. Estos últimos sirven como precursores del homoterpeno TMTT y el apocarotenoide β-ionona. En la rama (B), los sesquiterpenoides se forman a partir del farnesil difosfato FPP, derivado de la vía citosólica del ácido mevalónico MVA. Los ácidos grasos en la rama (C) siguen la ruta de las oxilipinas, que se fragmentan en derivados de GLV y JA. A partir del corismato se generan los indoles volátiles a partir del antranilato (rama D) y los bencenoides a partir de la fenilalanina (Phe; rama E) y el isochorismato (rama F), Figura tomada de (Maffei, 2010)

Generalmente, la emisión de VOCs ha sido asociada a la interacción de las plantas con patógenos y herbívoros, actuando como moléculas señalizadoras que activan la defensa directa de la planta y atraen a enemigos naturales como parasitoides y depredadores, promoviendo así una defensa indirecta (Bouwmeester et al., 2019). Por ejemplo, el linalool volátil induce resistencia en la vid contra el mildiú, actuando como una molécula señalizadora que activa mecanismos de defensa mediada por SA y JA (Avesani et al., 2023). De manera similar, una herida del tejido foliar desencadena una liberación inmediata de una mezcla de VOCs derivados de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente el JA y GLVs (Portillo-Estrada et al., 2021). Los GLVs, conocidos por sus notas verdes y herbáceas, incluyen aldehídos, y alcoholes de 6 átomos de carbono, como (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexenol y sus ésteres (Viswanath et al., 2020).

1.6 Respuesta inducida por Herida

Las plantas son altamente susceptibles a sufrir una variedad de daños tisulares en su entorno natural (Lup et al., 2016), que pueden ser el resultado de ataques bióticos, como los provocados por insectos herbívoros (Wasternack et al., 2006) o de condiciones climáticas adversas como el viento, el granizo y las heladas (Vega-Muñoz et al., 2020). Este tipo de daño se denomina comúnmente herida (Eulgem, 2000).

Como respuesta a la herida, las plantas activan una serie de mecanismos de defensa tanto en los tejidos directamente dañados (respuesta local) como en las zonas no afectadas (respuesta sistémica) (Leo et al., 2001). Entre estos mecanismos de defensa se encuentran: (i) la producción de proteínas defensivas como los inhibidores de proteasas (PIN), los cuales interfieren con la capacidad de los herbívoros para digerir

los nutrientes, (ii) la síntesis de sustancias tóxicas como la nicotina, y (iii) la liberación VOCs que atraen a insectos depredadores (Wasternack et al., 2006).

Tras una herida, se liberan rápidamente diversos volátiles, incluyendo etileno, terpenoides, benzenoides, así como volátiles derivados de la vía LOX (Bate & Rothstein, 1998). Entre estos se encuentran los volátiles GLVs (Viswanath et al., 2020), el JA y el MeJA. Estos VOCs se producen en el sitio de la herida y se transportan a través del aire a los sitios distales de la planta, actuando como moléculas señalizadoras y desempeñando un papel crucial en la defensa de la planta.

En este contexto, *S lycopersicum* ha sido empleado como un sistema modelo para comprender la vía de señalización inducida por herida (WIR). Se ha observado que tratamientos exógenos de MeJA, aplicados en forma de aerosol en un recipiente cerrado induce la expresión del gen *PIN*, principal marcador en la respuesta a herida. Estas observaciones sugieren que los jasmonatos volátiles podrían actuar como mensajeros entre plantas (Farmer & Ryan, 1992; Bowles, 1998). Este proceso se inicia con la biosíntesis de prosistemina que es procesada para generar sistemina (Figura 2), un polipéptido compuesto por 18 aminoácidos (Pearce et al., 1991). La sistemina, al unirse a un receptor quinasa en la membrana plasmática provoca una cascada de eventos de señalización intracelular que conducen a la liberación de ácido linoleico y linoléico, que da lugar al JA y GLVs por la acción de las LOX (Wasternack et al., 2006; Campos et al., 2014).

Estos hallazgos destacan la importancia del cultivo de tomate como un sistema modelo que permita comprender los mecanismos de señalización inducidos por heridas y subrayan su influencia en la investigación agrícola y biológica.

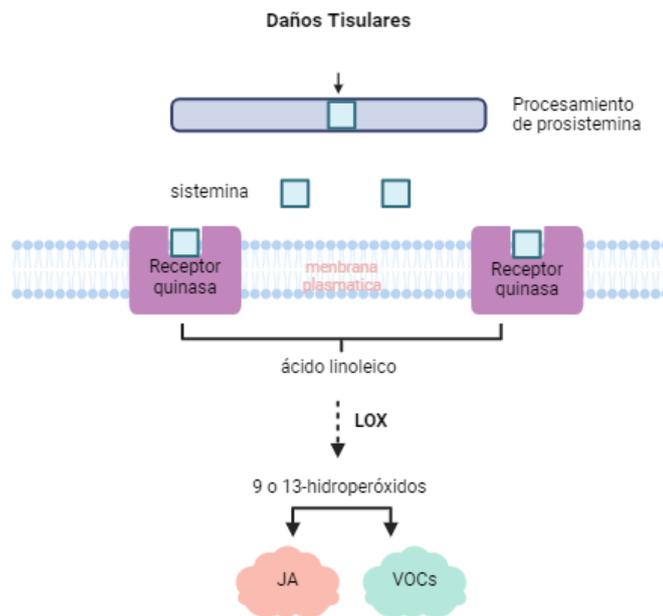


Figura 3 Modelo de acción de la sistemina en la producción de ácido jasmónico (JA) y volátiles de hoja verde (GLVs). La sistemina se origina a partir de prosistemina y tras la unión al receptor quinasa libera el ácido linoleico, sustrato de las lipoxigenasas (LOX) para dar lugar al JA y GLVs. Elaboración propia empleando Biorender

1.7 Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados y la síntesis de volátiles de hoja verde

Las heridas en las plantas o los ataques de herbívoros activan la vía LOX, lo que inicia la síntesis de GLVs. Estos compuestos volátiles son cruciales en la defensa de las plantas y en las interacciones entre plantas e insectos, al inducir defensas indirectas mediante la activación de genes relacionados con la defensa y la atracción de artrópodos carnívoros que localizan a los herbívoros (Halitschke et al., 2008). En maíz, se ha observado que el (Z)-3-hexenol, un GLV, es un inductor de defensas mucho más potente contra los herbívoros en comparación con señales de defensa comunes como el jasmonato de metilo, el salicilato de metilo y el etileno. Además, algunos GLVs pueden inhibir el crecimiento y la propagación de patógenos vegetales y, en situaciones de ataque, pueden actuar como señales aéreas para plantas cercanas, permitiéndoles prepararse y adaptarse mejor para enfrentar futuros desafíos (ul Hassan et al., 2015).

La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) para formar oxilipinas es un proceso esencial en la modificación de los lípidos. Las oxilipinas son una extensa familia de metabolitos secundarios con una variedad de estructuras y funciones biológicas, derivadas principalmente de la oxidación de los ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3). Los PUFAs (Figura3), son incorporados en la vía de las oxilipinas por la acción de lipasas de clase III, especialmente LIP1, que descomponen el triacilglicerol en glicerol y ácidos grasos libres (Garbowicz et al., 2018). Posteriormente, estos ácidos grasos son oxidados por las LOX, enzimas no hemo que contienen hierro y tienen un peso molecular de aproximadamente 100 kDa (ul Hassan et al., 2015).

En tomate se han identificado seis genes que codifican LOX denominados *TomloxA-F*, estos genes actúan sobre los ácidos grasos poliinsaturados, ya sea en la posición C9 o C13, para formar 9 y 13 hidropéroxidos (HPO). *TomLoxA*, *TomLoxB* y *TomLoxE* codifican para 9-LOX que se localizan fuera de los plastidios (ul Hassan et al., 2015) y catalizan el primer paso en la formación de 9-HPO (Chen et al., 2004). En contraste, *TomLoxC*, *TomLoxD* y *TomLoxF* se encuentran en el cloroplasto y codifican lipoxigenasas tipo 13-LOX que forman los 13-HPO (Pott et al., 2019).

Los HPO son transformados aún más para obtener numerosas moléculas de señalización como los jasmonatos (JA,MeJA) mediante la acción de la oxido aleno sintasa (AOS). Si la enzima que tiene lugar en la descomposición de los 13 HPD es el hidropéroxido liasa de (HPL) se generan compuestos antimicrobianos y antifúngicos, como los GLVs (Liavonchanka & Feussner, 2006; Andreou et al., 2009; Wasternack & Feussner, 2018).

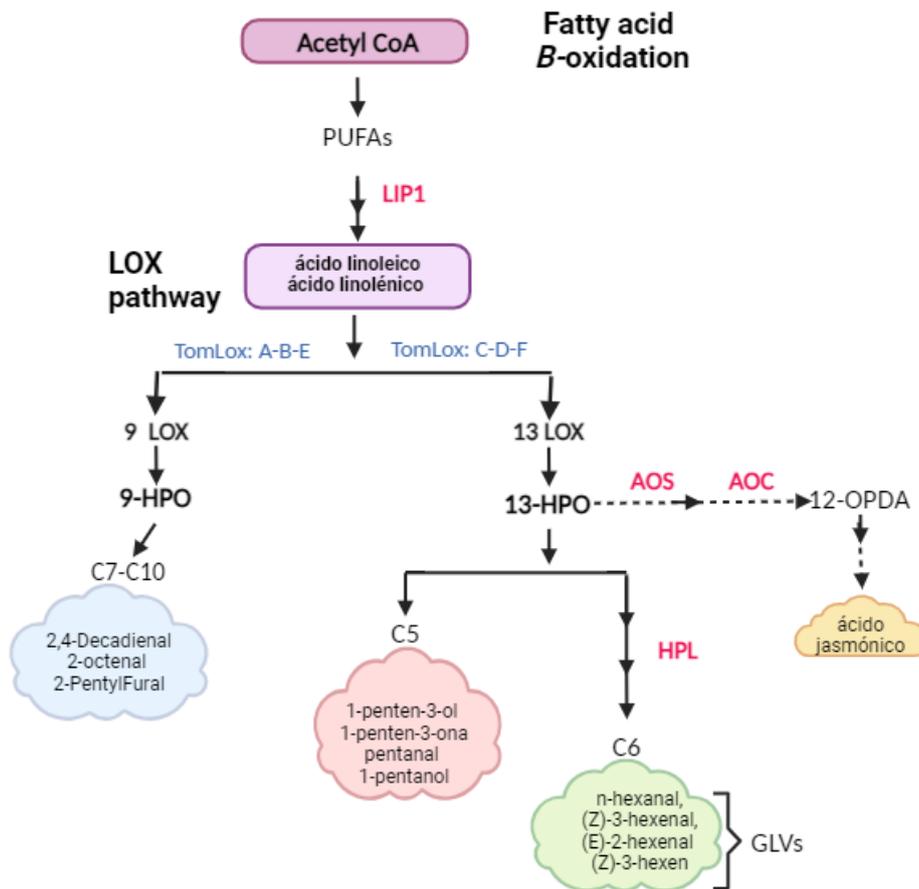


Figura 4. Ruta de las oxilipinas o lipoxigenasas LOX. Los PUFAs, se descomponen en ácido linoleico y linolénico por acción de LIP1. Posteriormente diferentes enzimas presentes en el diagrama (color rojo) actúan sobre los sustratos para formar diferentes compuestos volátiles C5, C6, así como el ácido jasmónico. La representación de varias flechas seguidas indica que hay diferentes reacciones enzimáticas. LIP1, lipasa1; LOX, lipoxigenasa; HPL, hidroperóxido liasa, HPO, hidroperóxidos; AOS, óxido de aleno sintasa; AOC, óxido de aleno ciclasa;12-OPDA,12-oxo-fitodienoico (Elaboración propia empleando BioRender).

2 OBJETIVOS

En respuesta a situaciones de estrés, como una herida, las plantas desencadenan la liberación de una serie de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs), que desempeñan un papel fundamental en su propia defensa y en la de las plantas vecinas. Este Trabajo Fin de Máster, tiene como objetivo principal estudiar el papel de *THT* y *Twi 1* en la alteración del volatiloма de plantas de tomate en respuesta a un daño mecánico por herida, y su posible impacto en la comunicación *inter-planta*.

Para alcanzar el objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos

1. Caracterización química de las plantas *RNAi_Twi1* y *35S: THT* mediante el análisis de su volatiloма tras la respuesta a herida.
2. Caracterización molecular de las plantas *RNAi_Twi1* y *35S: THT* a través del análisis de la inducción de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a herida.
3. Caracterización fenotípica de las plantas *RNAi_Twi1* y *35S: THT* mediante la cuantificación de callosa en respuesta a una herida mecánica.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Para la realización del presente Trabajo de Fin de Máster se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenecientes a dos líneas transgénicas: la línea transgénica 35S: *THT* (*THT* 7.3), la cual presenta una sobreexpresión del gen *THT* (L. Campos et al., 2014), y *RNAi_Twi1* (*Twi1* 28.3), que exhibe una supresión en la expresión del gen *Twi1* (Campos et al., 2019), así como de sus correspondientes parentales Money Maker. Todas las plantas fueron cultivadas en los invernaderos del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

Esterilización y germinación de semillas

Las semillas se germinaron mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Para ello, se envolvieron las semillas de las diferentes líneas en una malla cerrada con hilo y se procedió a su desinfección mediante una serie de lavados. En primer lugar, cada malla fue sumergida durante 30 minutos en un bote que contenía 100 mL de agua destilada, 100 mL de lejía y 3-4 gotas del detergente Tween 20. A continuación se realizaron 3 lavados continuos con agua estéril durante unos periodos de tiempo de 5, 10 y 15 minutos con el objetivo de ir eliminando progresivamente la solución de lavado. Finalmente, las semillas se sembraron en placas Petri de 14 cm de diámetro con papel de filtro y 14 mL de agua destilada estéril. Todo este proceso se llevó a cabo en la cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de asepsia. Una vez sembradas, las placas se sometieron a oscuridad durante 48 horas a 24 °C. Transcurrido este tiempo, las semillas fueron expuestas a luz durante 48 horas más a 24 °C para posteriormente sembrarlas en tierra.

Condiciones de cultivo

Una vez germinadas las semillas se cultivaron en el invernadero. Cada semilla fue sembrada en una maceta individual (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro inferior) que contenían turba y perlita a partes iguales y se cultivaron en condiciones de invernadero a una temperatura entre 20-26 °C, con una humedad relativa del 50-70 % y un fotoperiodo de día largo, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las macetas fueron regadas de manera manual con solución nutritiva de Hoagland.

3.2 Herida y toma de muestras

Después de 4 semanas de crecimiento, cuando las plántulas tenían unas 4-5 hojas verdaderas, se practicaron 5 heridas en la nervadura de los 5 folíolos de la tercera y cuarta hoja utilizando una pinza (Figura 4) dentada para dañar tanto la cara abaxial como adaxial de la hoja. Como muestra control, se tomaron los mismos folíolos de la planta sin herir.



Figura 5. Foliolos de tomate tras realizar una herida mecánica

La recolección de muestras del material vegetal se realizó 24 horas después de la herida. El material fue recogido en botes de plástico de 10 mL y sumergido inmediatamente en nitrógeno líquido, congelándose a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Luego, el material fue homogenizado en condiciones continuas de frío utilizando un molino mezclador MM 400 RetschTM.

Al mismo tiempo, se realizó la recolección de muestras del material vegetal destinado a microscopía 24 horas después de la herida. Se tomaron 2 muestras de foliolos heridos de las tercera y cuarta hoja y se recogieron en tubos Falcon[®] con tampón FAE (50% etanol absoluto, 5% ácido acético glacial, 3,7% formaldehído y agua milliQ hasta llegar al 100%) para su posterior tratamiento de fijación.

Como muestras control, se tomaron foliolos de la planta sin herir.

3.3 Análisis de compuestos orgánicos volátiles mediante cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para el análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) se pesaron 100 mg de hoja de tomate homogeneizada en un vial hermético de vidrio de 7mL. Posteriormente, se añadió 1 mL de una solución saturada con CaCl_2 ($\sim 6\text{ M}$) y 100 μL de EDTA 750 mM pH 7.5 a cada vial, con el fin de mantener un ambiente químicamente estable para optimizar la extracción de compuestos volátiles, se cerró herméticamente y se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos.

Para la extracción de los VOCs del tejido, se utilizó la técnica de micro extracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME, *Head Space Solid-Phase Microextraction*). Con ese fin, las muestras se incubaron durante 10 minutos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, y los compuestos se extrajeron a la misma temperatura durante 20 minutos utilizando una fibra PDMS/DVB (Supelco, Bellefonte, PA, USA). La desorción de los compuestos adheridos a la fibra se llevó a cabo durante 1 minuto a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, los VOCs fueron analizados empleando un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Santa Clara, CA, USA), acoplado a un detector de masas Agilent 5975B Inert XL de impacto electrónico (IE) con una energía de ionización de 70eV y una temperatura de fuente de $230\text{ }^{\circ}\text{C}$. La cromatografía se llevó a cabo en una columna capilar de sílice de 60 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, con una fase estacionaria compuesta por 5% fenil y 95% dimetilpolisiloxano. Las condiciones térmicas del horno fueron $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos., una rampa de $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta $250\text{ }^{\circ}\text{C}$, y 5 minutos a temperatura

constante de 250 °C. El gas portador fue helio a un flujo constante de 1,2 mL/min. El detector de masas registró 6 escaneos por segundo en un rango de m/z de 35-250.

Los datos de GC-MS fueron procesados utilizando el software MetAlign para corregir la línea base, alinear los cromatogramas y eliminar el ruido. Posteriormente, se exportaron a Excel para eliminar picos de baja intensidad (ruido) y normalizarlos según el día y hora de extracción. Se realizó un análisis ANOVA de una vía para cada compuesto volátil detectado, para determinar si existían diferencias significativas entre los diferentes grupos. El procesamiento adicional se llevó a cabo con MassHunter Quantitative Analysis (Agilent) y a identificación de los VOCs se realizó comparando tanto el espectro de masas de cada compuesto con la librería NIST del equipo como el tiempo de los estándares proporcionados por el servicio de Metabolómica del IBMCP. La cuantificación se realizó por el método del área del pico, anotando los picos de masa representativos y su tiempo de retención para cada VOC identificado. La intensidad en las muestras se relaciona con la abundancia del compuesto.

Extracción y cuantificación del RNA total

Para la extracción de RNA de hojas de tomate se utilizó tejido fresco previamente homogeneizado y congelado a -80 °C, y se realizó en condiciones de baja temperatura utilizando el kit de extracción Nucleospin® RNA Plant (MACHEREY-NAGEL), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

La cuantificación del RNA extraído de cada una de las muestras se realizó utilizando el espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000, que fue calibrado con un blanco de agua libre de RNAsas (suministrado en el kit de extracción de RNA) y se midió la absorbancia a 260 nm. Además, para asegurar la calidad del RNA, se verificaron los ratios de absorbancia a diferentes longitudes de onda $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ durante la misma medición, y todos los RNAs analizados mostraron valores entre 1,8 y 2,0.

Retro transcripción

Para obtener el cDNA se utilizó el kit comercial PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. El volumen final de reacción se preparó mezclando el PrimeScript RT enzymeMix con H₂O Milli-Q hasta obtener la cantidad deseada. La reacción se incubó a 37 °C durante 15 minutos y posteriormente se realizó una incubación a 85 °C durante 15 segundos para inactivar la enzima. Finalmente, las muestras se diluyeron con H₂O Milli-Q y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en las PCR cuantitativas en tiempo real (RT-qPCR).

Amplificación cuantitativa de DNA (PCR cuantitativa)

Una vez se dispuso del cDNA, se llevaron a cabo amplificaciones cuantitativas de cada una de las muestras, con el fin de evaluar la expresión de varios genes de tomate que participan en la respuesta a herida. Para ello, se utilizó el reactivo SYBR® Green PCR Máster Mix (Applied Biosystems), añadiendo las cantidades de SYBR, agua Milli-Q, cDNA y cebadores indicados por el fabricante. Cada pareja de oligos fue testada previamente para comprobar que su eficiencia de amplificación estaba entorno al 100%.

Se utilizaron placas de 96 pocillos MicroAmpFast 96-Well ReactionPlate (Applied Biosystems), a las cuales se les agregó un volumen final de 10 µL de reacción en cada

pocillo. Luego, se selló la placa, se centrifugó y se introdujo en el equipo de RT-qPCR (QuantStudio 3 - 96-Well 0.1-mL Block). En todos los ensayos se empleó el gen endógeno ACTINA como control interno y se realizaron tres repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA. La Tabla indica las secuencias de los oligonucleótidos empleados.

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

Gen	Cebador directo (Forward)	Cebador reverso (Reverse)
<i>LIP₁</i>	CAACTGAAGTGTTTCATACTATGCGATAA	CCACGAGTAGTCGAAATCAGTGA
TomLoxC	TGAAGCATTTTCAGCAGTGAAGA	GGCACCACCGCGTGTAG
<i>TCI21</i>	ACTCGTCCTGTGCTTTGTCC	CCCAAGAGGATTTTCGTTGA
Actina	CTAGGCTGGGTTTCGCAGGAGATGATGC	GTCTTTTTGACCCATACCCACCATCACAC

3.4 Tinción de callosa con azul de Anilina en hojas de *S lycopersicum*

El tejido vegetal conservado en tampón FAE fue fijado sometiéndolo a vacío con la ayuda de una bomba de vacío durante 10 minutos. Luego, se eliminó el exceso de FAE, se añadió etanol al 70% y se almacenaron las muestras a 4°C durante 24 horas. Después de la fase de fijación, las muestras se destiñeron aplicando soluciones crecientes de etanol cada 30 minutos (85%, 95% y 100%). La última aplicación se realizó 3 veces hasta lograr que los tejidos se destiñeran completamente. Para llevar a cabo la tinción de callosa, se retiró 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 agregó una solución de anilina al 0,05% en el mismo tampón a cada muestra. Las muestras se mantuvieron en oscuridad durante una noche con agitación. Finalmente, se realizó el cambio de la solución de anilina y después de 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.

3.5 Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis de varianza mediante la prueba estadística Two Way Anova para los resultados obtenidos, con el fin de verificar si existían diferencias significativas entre los distintos genotipos y tratamientos empleados. Previamente, se evaluó la igualdad de varianzas mediante la prueba de igualdad de varianzas para determinar si podían asumirse varianzas iguales para todas las variables estudiadas. En caso de asumir varianzas iguales, se realizó ANOVA y su correspondiente prueba de separación de medias Fisher. Se consideró que un valor de $p < 0.05$ era estadísticamente significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Graphad Prisma 9.

Los análisis de datos multivariable del volatiloma se efectuaron con los programas informáticos MetAlign y MetaboAnalyst, utilizando la varianza unitaria (UV) como método de escalado en el análisis de componentes principales (PCA).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de VOCs de plantas transgénicas *RNAi_Twi1* y su parental silvestre en respuesta a herida

Estudios previos han demostrado que el gen *Twi 1* se induce tras una herida (O'Donnell et al., 1998). Esta característica lo convierte en un elemento de interés para comprender su papel en la respuesta a este tipo de estrés.

Con el fin de profundizar en la caracterización de las plantas transgénicas que silencian el gen *Twi1*, se llevó a cabo un estudio para evaluar la influencia de este gen en la emisión VOCs tras realizar una herida.

Para este estudio, se compararon los volatílo mas emitidos por plantas transgénicas *RNAi_Twi1* y su parental silvestre WT (Campos et al., 2019) tras 24 horas de haber sufrido un daño mecánico (ver Materiales y Métodos). Para ello se realizó un análisis metabolómico no dirigido utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los datos obtenidos se procesaron con los programas MetAlign y MetaboAnalyst, y se realizó un análisis de componentes principales (PCA) tal como se observa en la Figura 6.

La PC1 (36,6% de la varianza) separó las plantas por genotipo: las WT se ubican en la parte positiva, mientras que las *RNAi_Twi1* se encuentran en la parte negativa. Por otro lado, el PC2 (21,9%) diferencia las plantas según su respuesta a herida: las plantas mock no heridas se encuentran en la parte positiva y las heridas en la parte negativa. Estos resultados indican que el genotipo de las plantas tiene un mayor impacto en la emisión de VOCs que el efecto provocado por la herida.

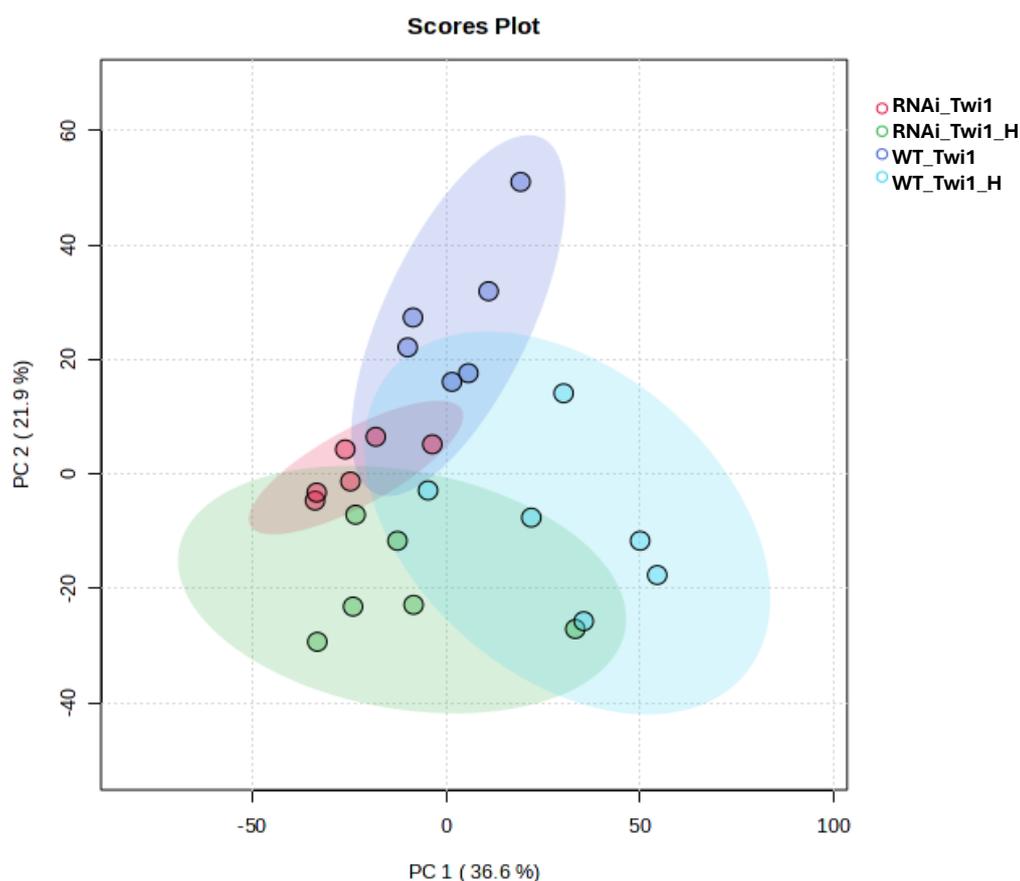


Figura 6 Score plot del análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos orgánicos volátiles basado en la abundancia de las señales de los espectros de masas dentro de un rango m/z de 35 a 250, correspondiente a hojas de plantas de tomate *RNAi_Twi1* y WT, heridas (H) o sin herir. Los colores indican los diferentes genotipos y tratamientos: Rojo: *RNAi_Twi1* Mock; Verde: *RNAi_Twi1*, Herida; Morado: WT, Mock; Celeste: WT, Herida

Para identificar los compuestos volátiles emitidos diferencialmente por las plantas de tomate heridas, tanto WT como *RNAi_Twi1*, se analizó la distribución de los iones identificados en el análisis de (GC-MS). El gráfico *loading plot* condensado del PCA (Figura 7) muestra la contribución de cada conjunto de iones, con el mismo tiempo de retención, en la formación de las componentes principales. Analizando la parte positiva de la componente principal 1 (PC1) se identifican los iones más abundantes en las plantas WT heridas (azul), mientras que los iones situados en la parte negativa de la PC1 corresponden a las plantas *RNAi_Twi1* heridas (verde).

Se observó que las plantas WT heridas emitieron volátiles de modo específico, lo que sugiere un papel activo de estos compuestos en la respuesta a herida. Por otro lado, las plantas *RNAi_Twi1* dejaron de emitir volátiles, ya que no se identificaron compuestos que se emitieran de forma específica en este genotipo. Esto sugiere que el gen *Twi1* podría ser crucial para la biosíntesis o liberación de estos compuestos y que su supresión podría afectar negativamente la capacidad de la planta para responder eficazmente ante un estrés biótico.

En cuanto, a las plantas WT heridas (azul), se identificaron varios compuestos volátiles de la familia de los GLVs, incluyendo Z-3-Hexenal, Butanoato de Z-3-Hexenilo

(HB), E-2-Pental, 1-Penten-3-ol, y Z-2-Penten-1-ol, así como el 2-etilfurano. Estos compuestos están estrechamente relacionados con la vía LOX, que se activa como respuesta al estrés por herida o al ataque de herbívoros (Ul Hassan et al., 2015). Estos resultados concuerdan con estudios previos que indican que estos compuestos se liberan inmediatamente después del daño mecánico (Farmer & Ryan, 1992; Bate & Rothstein, 1998; Reymond et al., 2000; Leo et al., 2001; B. Wang et al., 2015). Estos VOCs actúan como señales tanto en la propia planta como entre las vecinas, exhibiendo una regulación por retroalimentación positiva (Bate & Rothstein, 1998). Esto facilita una serie de respuestas de defensa y preparan a las plantas receptoras para responder de manera más eficiente a futuros ataques (Baldwin et al., 2006).

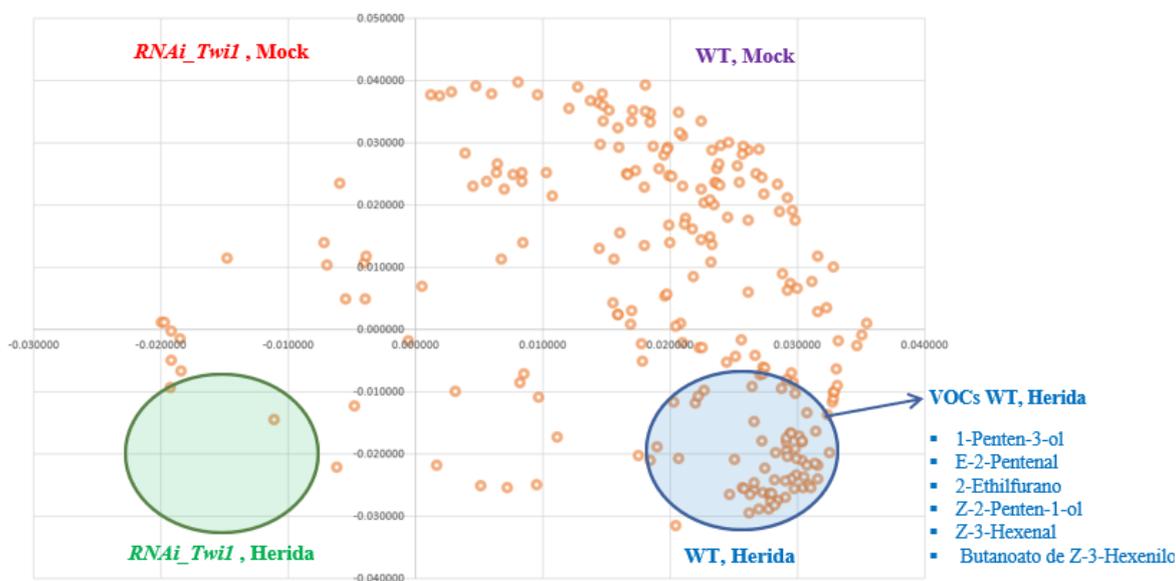


Figura 7 Loding plot condensado correspondiente a hojas de plantas de tomate WT y *RNAi_Twi1* heridas. En azul se indican GLVs identificados a partir de los iones diferenciales de plantas WT heridas

Se ha demostrado que los GLVs pueden ser compuestos bactericidas y fungicidas (Matsui et al., 2006). La inducción significativa del Z-3-Hexenal (Figura 8 A) tras la herida podría deberse a esta actividad biológica, ya que estudios previos muestran que posee efectos bacteriostáticos contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Nakamura & Hatanaka, 2002). Su reducción y esterificación produce el compuesto HB (Figura 8B), un éster volátil de hoja verde que ha sido descrito como un compuesto natural potente que induce el cierre estomático y brinda una mayor resistencia a *Pseudomonas syringae* pv. *tomate* (López-Gresa et al., 2018; Payá et al., 2020).

De igual manera, se ha identificado que la síntesis de volátiles C5 aumenta en las hojas después de una herida mecánica (Shen et al., 2014). Estos resultados son consistentes con nuestros hallazgos, donde identificamos el volátil 1-Penten-3-ona (Figura 8C), el Z-2-Penten-1-ol (Figura 8D) y el E-2-Pental, que mostraron un aumento significativo en las plantas WT tras un daño mecánico.

En conjunto, estos resultados sugieren que tanto los VOCs C5 y C6, desempeñan un papel crucial en la respuesta de las plantas frente a una herida mecánica, actuando

como señales de alerta que activan mecanismos de defensa. La mayor presencia de estos compuestos en las plantas WT, en comparación con las plantas *RNAi_Twi1*, indica una diferencia en la capacidad de respuesta al estrés entre los dos genotipos.

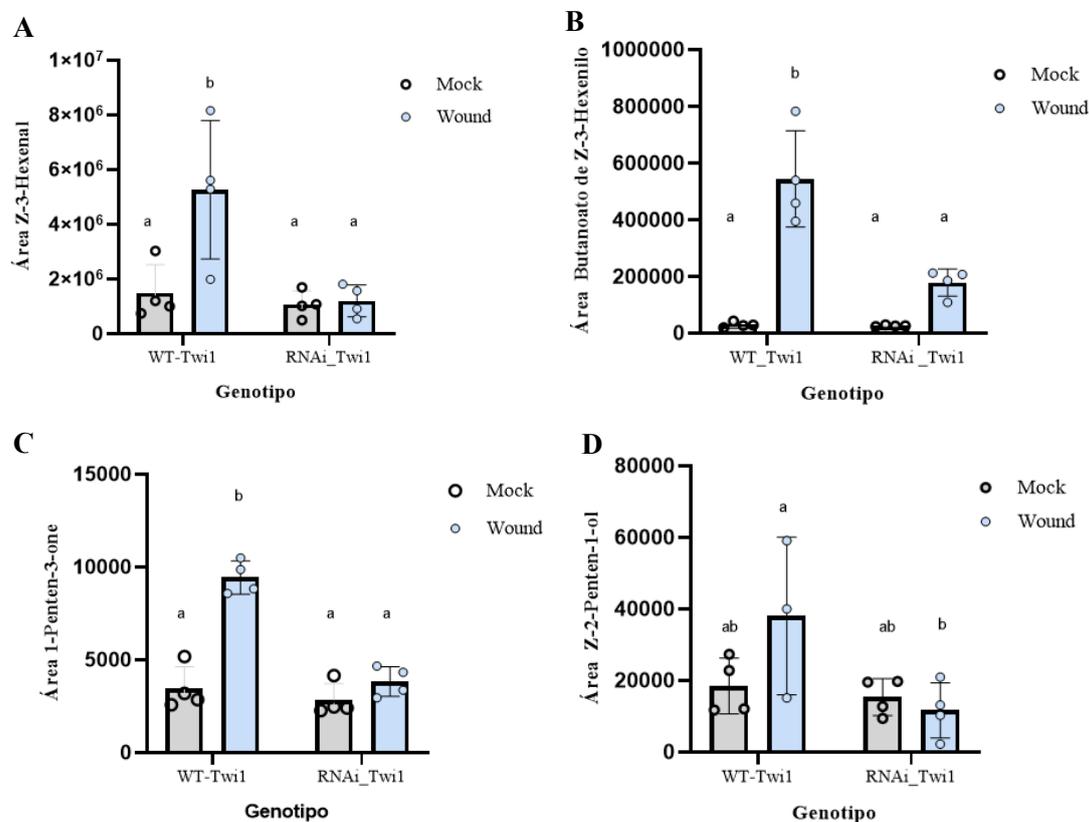


Figura 8 Emisión de GLVs de hojas de tomate WT (*WT-Twi1*) ante una herida mecánica. (A) Emisión de Z-3-Hexenal; (B) Emisión Butanoato de Z-3-Hexenilo; (C) Emisión de 1-Penten-3-one; (D) Emisión de Z-2-Penten-1-ol; Cuantificación relativa del área del pico del cromatograma en el tiempo de retención correspondiente a los compuestos orgánicos volátiles descritos anteriormente, de plantas heridas (Wound) y plantas sin herir (Mock). Las letras muestran la información de agrupación utilizando el método de Two way Anova con un nivel de significancia del 5% ($p\text{-value} < 0,05$).

Sorprendentemente, a pesar de la distribución diferencial del volatiloma entre plantas WT y *RNAi_Twi1* tras haber sido heridas, no se identificaron compuestos volátiles específicos de las plantas *RNAi_Twi1* heridas. El análisis del *loading plot* no mostraba apenas iones, sugiriendo que estas plantas, no responden de la manera clásica a la herida, ya que, aunque no emite ningún volátil específicamente se ven disminuidos algunos volátiles comparados con las plantas WT heridas.

Los VOCs analizados tras la herida se sintetizan a través de la vía de degradación de los ácidos grasos C18, como ácido linoleico y ácido linolénico. Dado que *Twi1* actúa en otra vía de señalización, glicosilación de los flavonoides (Campos et al., 2019), se esperaba identificar VOCs específicos en la respuesta a herida. Sin embargo, al silenciar una glicosil transferasa que potencialmente conjuga GLVs, podría producirse un descenso en los niveles de estos volátiles característicos de la herida. Este resultado

sugiere que *Tw1* 1 podría intervenir en la glicosilación de VOCs emitidos tras un daño mecánico.

La glicosilación de los GLVs es un proceso crítico para su almacenamiento y liberación. Los GLVs exógenos, emitidos por plantas vecinas, no solo se reemiten parcialmente como volátiles o se convierten en otros GLVs (Matsui et al., 2012), sino que también se almacenan en forma de compuestos no volátiles, como glucósidos (Gachon et al., 2005). Un ejemplo claro de esto es el caso de las plantas de tomate expuestas a Z-3-hexenol, que acumulan principalmente este mismo GLV en su forma glucosidada, Z-3-hexenil vicianósido (Sugimoto et al., 2021). De manera similar, la exposición de *A. thaliana* a una variedad de alcoholes volátiles, como Z-2-pentenol, Z-3-hexenol, Z-3-heptenol y Z-3-octenol, condujo a la detección de los glucósidos de estos alcoholes volátiles (Sugimoto et al., 2015).

La acumulación de estos compuestos defensivos conjugados se propone como uno de los mecanismos para preparar la defensa de las plantas. Al glicosilarse, los GLV quedan inactivos, pero pueden liberarse rápidamente y volver a su estado activo cuando se presenten desencadenantes del estrés (Ameje et al., 2020).

Finalmente concluimos que los mecanismos de defensa metabólica en las plantas *RNAi_Twi1* podrían estar alterados en comparación con las plantas WT. Esto sugiere que la modificación genética de estas plantas podría haber afectado a la biosíntesis o la regulación de los compuestos volátiles emitidos en la respuesta a herida. La glicosilación o conjugación es una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios (Zhang et al., 2022; Altanzul, 2023). Esta transformación desempeña un papel fundamental en diversas funciones fisiológicas incluida la regulación de la homeostasis hormonal, la desintoxicación de xenobióticos y la biosíntesis y almacenamiento de compuestos secundarios (Gachon et al., 2005). Considerando que las plantas *RNAi_Twi1 28.3* presentan niveles reducidos de los volátiles clásicos de respuesta herida (Figura 8), podemos suponer que la glicosilación de VOCs podría ser un mecanismo temprano en la respuesta a la herida.

4.2 Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a herida en plantas de tomate *Tw1_28.3*.

Para investigar si la herida afecta a nivel transcriptómico las posibles vías de formación de VOCs derivados de ácidos grasos, se realizó un análisis mediante qRT-PCR de varios genes implicados en su biosíntesis, incluyendo *LIP1* y *TomLoxC*. *LIP1* descomponen el triacilglicerol en glicerol y ácidos grasos libres (Garbowicz et al., 2018). *TomLoxC* es esencial para la producción de GLVs y otros compuestos relacionados, como el n-hexanal, (Z)-3-hexenal y (Z)-3-hexenol, así como compuestos C5, como el 1-penten-3-ol y pentanal (Chen et al., 2004; Shen et al., 2014).

Además, se analizó el nivel de expresión de *TCI21* como gen marcador de respuesta herida.

El análisis de expresión génica reveló que la línea *RNAi_Twi1* presenta niveles basales más bajos de los genes *LIP1* y *TomLoxC*, en comparación con la línea WT (Figuras 9A y 9C). Esta diferencia en la expresión génica persiste incluso después de la realización de una herida mecánica, ya que no se observó un aumento significativo en la expresión de estos genes.

Dado que tanto LIP 1 (Garbowicz et al., 2018) como TomLoxC (Shen et al., 2014) participan en la formación de compuestos volátiles C5 y C6 derivados de la vía LOX, la menor expresión de estos genes en las plantas *RNAi_Twi1* podrían explicar la ausencia o la baja presencia de estos VOCs en estas plantas transgénicas, tal como se observó en el análisis de volatiloma (Figura 7)

La ausencia de una respuesta inducible en la expresión de genes de la vía LOX en la línea *RNAi_Twi1* sugiere que la modificación genética en estas plantas podría haber alterado la regulación de la respuesta defensiva ante el daño mecánico. Se requieren investigaciones adicionales para identificar los mecanismos moleculares precisos que subyacen a esta alteración.

Respecto a la expresión relativa del gen *TCI21* (Figura 9B), un inhibidor de quimi tripsina involucrado en la respuesta a herida en tomate (Lisón et al., 2006), se observó una mayor inducción en la línea WT tras la herida. Aunque esta inducción también se presentó en la línea transgénica *RNAi_Twi1*, fue significativamente menor en comparación con su parental. Esto podría deberse a que TCI21, una proteína que requiere glicosilación para su funcionalidad (Lisón et al., 2006), pierde esta capacidad en la línea *RNAi_Twi1*, lo que podría afectar a su inducción y posiblemente su eficiencia en la respuesta a la herida.

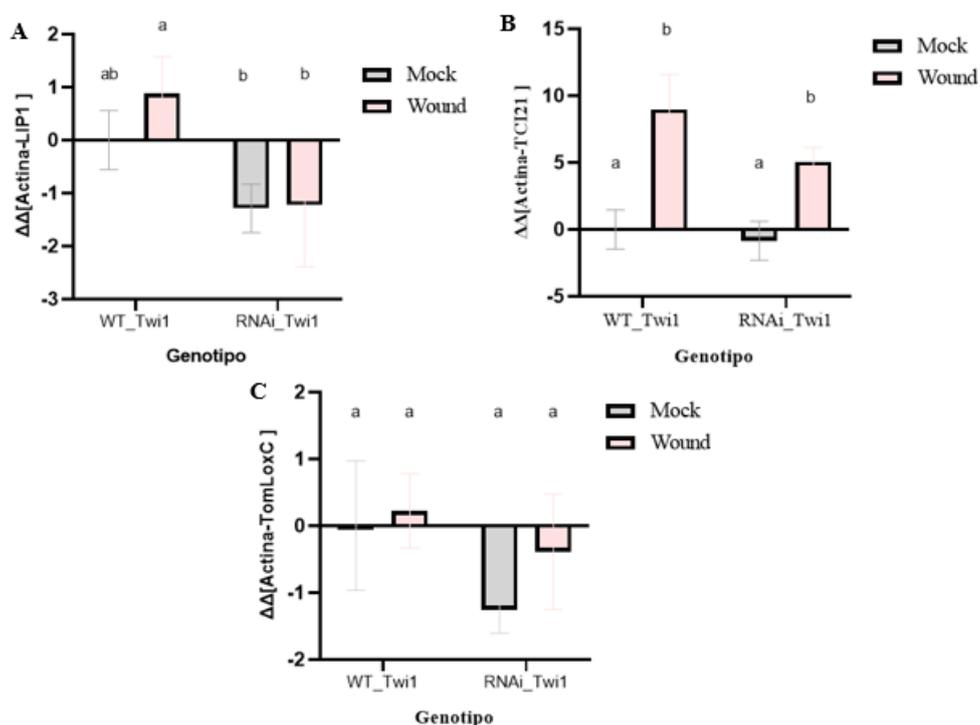


Figura 9 Expresión relativa de los genes *LIP1*, *TomLoxC* y *TCI21* y en hojas de plantas transgénicas *RNAi_Twi1* y su parental *Money Maker* (*WT_Twi1*) después de 24 horas de la herida (*Wound*) y sin herir (*Mock*) A Expresión relativa del gen *LIP1*; B Expresión relativa del gen *TomLoxC*; C Expresión relativa del gen *TCI 21*. La expresión de mRNA en hojas de tomate para estos genes se analizó mediante qRT-PCR, utilizando el gen de la actina como referencia para normalizar los datos. Los controles no heridos (*WT_Twi1 Mock*) se tomaron como valor de referencia. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas biológicas del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test ANOVA con un valor *p* menor de 0.05 entre las distintas variedades de tomate.

4.3 Análisis de callosa en plantas *RNAi_Twi1* y su parental silvestre en respuesta a herida

Las plantas heridas deben activar mecanismos de protección para sellar eficazmente el tejido dañado, evitar la pérdida de agua y la invasión de patógenos oportunistas (Bate & Rothstein, 1998). En las áreas donde se produce una herida, las células experimentan daños significativos, lo que conlleva a una muerte celular programada de algunas filas celulares adyacentes a las células rotas, resultando en el cierre físico de la herida (Cui et al., 2013). Este proceso se combina con la deposición local de lignina, callosa y compuestos fenólicos (Savatin et al., 2014).

La callosa, un polímero (1,3)- β -glucano ampliamente distribuido en las plantas superiores, desempeña un papel crucial no solo en el crecimiento y desarrollo normal, sino también en la defensa de las plantas frente a patógenos y otras amenazas. Tras un ataque, la callosa se deposita entre la membrana plasmática y la pared celular en el sitio afectado, actuando como una barrera física (Wang et al., 2021).

Las glicosiltransferasas (GT) desempeñan un papel fundamental en la biosíntesis y el mantenimiento de la pared celular. Estas enzimas son las encargadas de catalizar la elongación de las cadenas de glucanos, un proceso esencial para la síntesis de compuestos como la celulosa y la callosa (Scheible & Pauty, 2004). Se ha sugerido que la UGT1 puede transferir UDP-glucosa desde la sacarosa sintasa a la callosa sintasa, ayudando así a crear un canal de sustrato para la síntesis de callosa en la placa celular en desarrollo (Hong et al., 2001).

Con el objetivo de evaluar el papel de los productos generados por *Twi 1* en la deposición de callosa tras la herida, se compararon las diferencias fenotípicas entre la línea *RNAi_Twi1* y su parental silvestre WT. Para ello, se realizó una tinción con azul de anilina en hojas heridas mecánicamente y se midió la intensidad de fluorescencia tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

Los resultados mostraron que las hojas de la línea *RNAi_Twi1* presentan una fluorescencia de callosa mayor tras ser heridas, en comparación con las hojas de su parental WT (Figura 10).

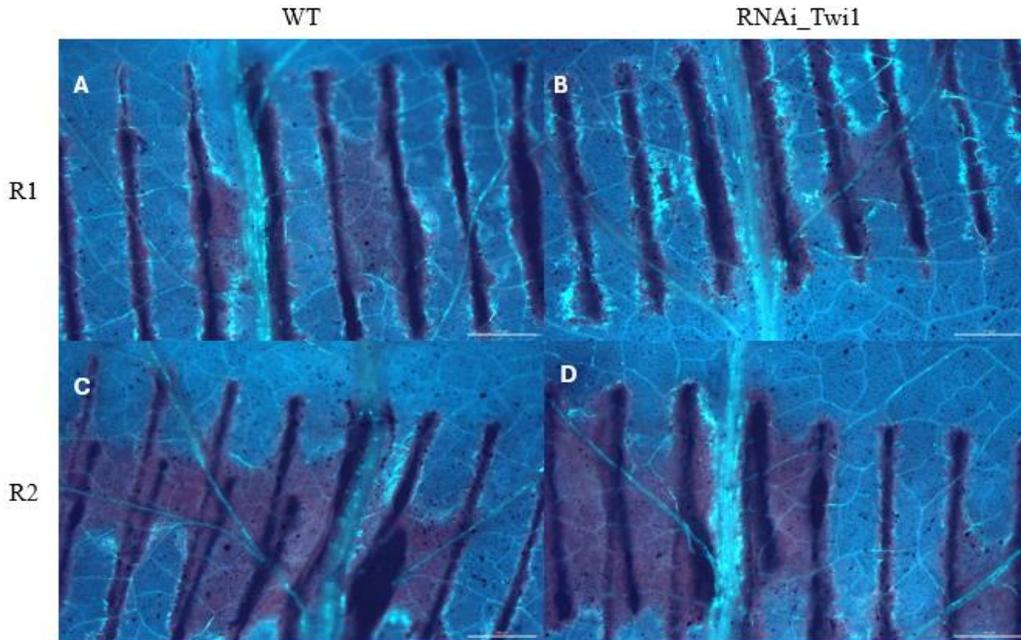


Figura 10 Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de la línea *RNAi_Twi1* y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. Las letras indican las muestras (A) WT Replica 1; (B) *RNAi_Twi1* Replica 1; (C) WT Replica 2; (D) *RNAi_Twi1* Replica 2.

Específicamente, se observó que las hojas heridas de la línea transgénica *RNAi_Twi1* presentan una fluorescencia de callosa mayor que las hojas heridas de su parental WT (Figura 11). Estos resultados sugieren que el silenciamiento de *Twi1*, genera una mayor acumulación de callosa, por lo tanto, afecta a la respuesta de defensa de la planta tras una herida; mediante un mecanismo desconocido que deberá ser corroborado en posteriores trabajos.

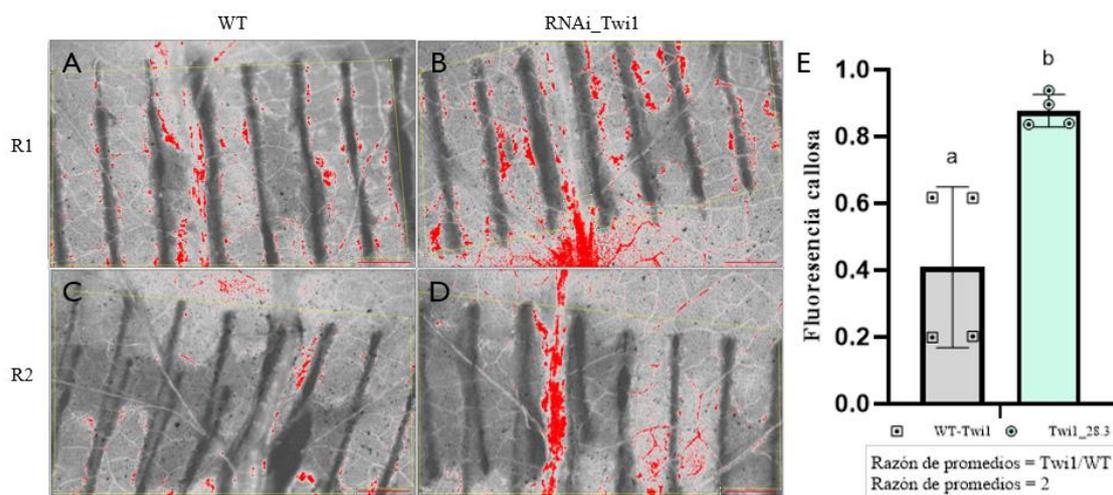


Figura 11 Cuantificación de la Fluorescencia de callosa con ImageJ de hoja de tomate de la línea *RNAi_Twi1* y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. Las letras indican las muestras (A) WT Replica 1; (B) *RNAi_Twi1* Replica 1; (C) WT Replica 2; (D) *RNAi_Twi1* Replica 2; (E) Cuantificación de fluorescencia de callosa en dos hojas de cada línea.

4.4 Análisis de VOCs de plantas transgénicas 35S: *THT* y su parental silvestre en respuesta a herida.

Para evaluar si *THT* influye en la emisión de VOCs en respuesta a una herida, se compararon las líneas transgénicas de tomate 35S: *THT* y su parental silvestre (WT). La herida se infligió mecánicamente utilizando una pinza dentada, y las muestras se recolectaron 24 horas después, según se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Se utilizó un enfoque metabolómico no dirigido mediante GC-MS para identificar y cuantificar los VOCs emitidos por las plantas tras el estrés causado por la herida. El daño mecánico controlado de las hojas en condiciones de laboratorio puede imitar los efectos del estrés físico que experimentan las plantas en su entorno natural (Portillo-Estrada et al., 2021).

A diferencia de lo que ocurrió con la línea *RNAi_Twi1*, en las plantas 35S: *THT*, el estrés ocasionado por una herida mecánica tuvo un impacto significativo en la emisión de VOCs, mayor que el efecto del genotipo, como se observó en el análisis de componentes principales PCA (Figura 12).

La primera componente (PC1), que explica el 42.2% de la varianza, separó las plantas debido al volatiloma provocado por la herida: las muestras heridas se situaron en la parte positiva de la PC1 y las no heridas en la negativa. Por otro lado, la segunda componente principal (PC2), que explica el 16.3 %, separó las plantas por genotipo: las plantas 35S: *THT* se encuentran en la parte positiva de la PC2 y su fondo genético en la negativa.

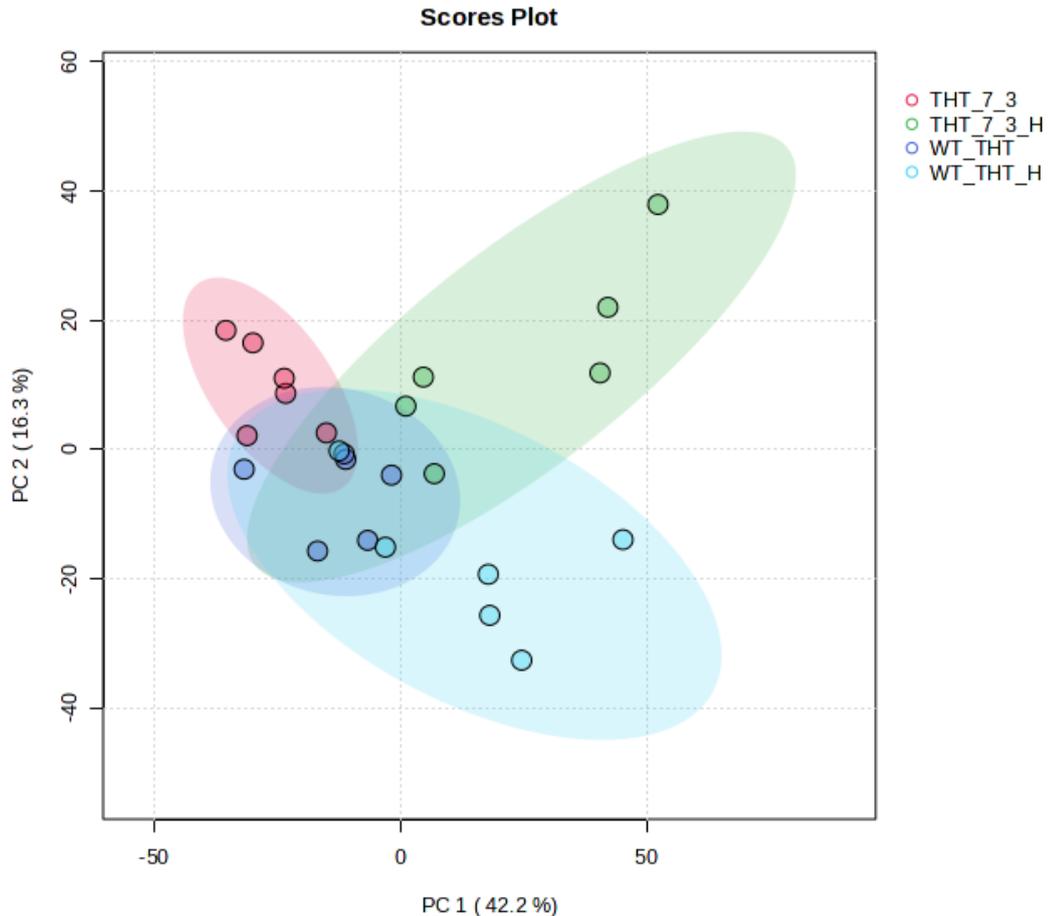


Figura 12 Score plot del PCA basado en la abundancia de las señales de los espectros de masas dentro de un rango m/z de 35 a 250, correspondiente a hojas de plantas de tomate 35S: *THT* (*THT_7.3*) y *WT* (*WT_THT*), heridas (*H*) o ilesas. Los colores indican los diferentes genotipos y tratamientos: Rojo: *THT* 7.3 Mock; Verde: *THT* 7.3, Herida; Morado: *WT*,Mock ; Celeste: *WT*,Herida

Para identificar los compuestos volátiles emitidos de manera diferencial por las plantas 35S: *THT* y las plantas *WT*, se elaboró un gráfico loading plot condensado del análisis de PCA (Figura 13). Este gráfico muestra la contribución de cada conjunto de iones, con el mismo tiempo de retención, en la formación de las componentes principales.

Analizando la parte positiva de la componente principal 2 (PC2) se identifican los iones más abundantes en las plantas 35S: *THT* heridas (verde), mientras que los iones situados en la parte negativa de la PC2 corresponden a las plantas *WT* heridas (azul).

A diferencia de las plantas *RNAi_Twi1* donde no se observó una emisión específica de compuestos volátiles, en las plantas 35S: *THT* si se identificó la emisión de volátiles específicos del genotipo tras la herida. Esto sugiere que la sobreexpresión de 35S: *THT* altera la respuesta de las plantas a la herida. Por otro lado, las plantas *WT* heridas también emitieron volátiles de manera específica, coincidiendo con los volátiles observados en el parental silvestre de *RNAi_Twi1*. Entre estos compuestos se encuentran los principales GLVs y volátiles C5, como el 1-Penten-3-one, Z-3-Hexenal, Butanoato de Z-3-Hexenilo (HB), 2,4-Hexadienal y 2-etilfurano.

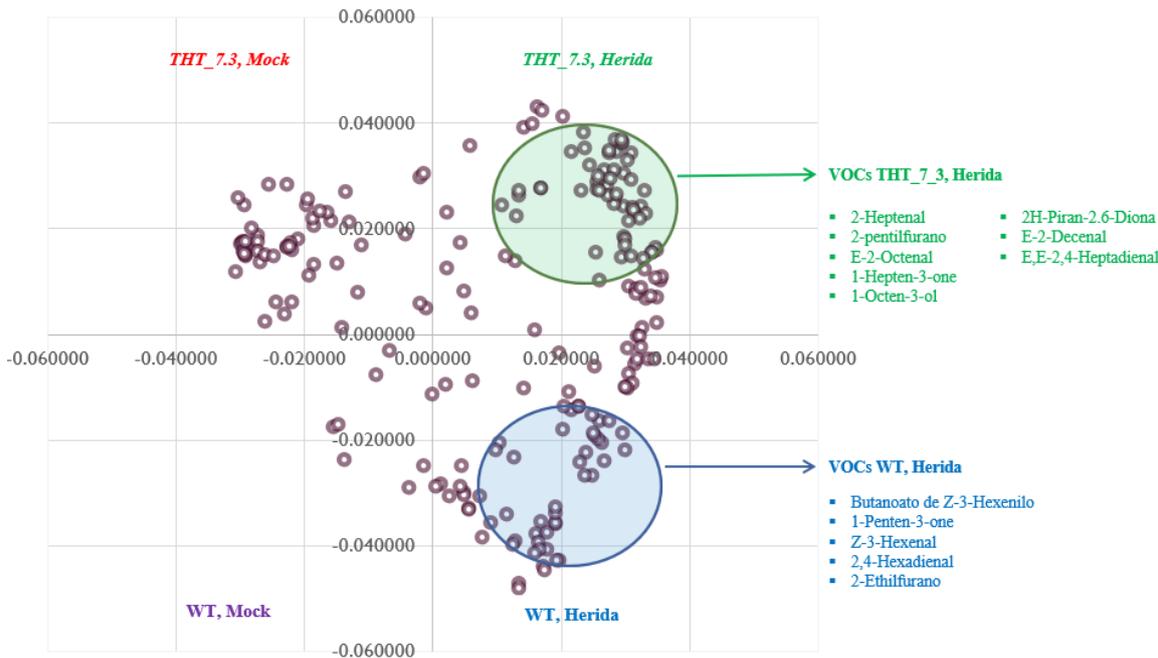


Figura 13 Loding plot del PCA correspondiente a hojas de plantas de tomate 35S: THT y WT heridas. En color se indican los VOCs identificados a partir de los iones diferenciales de plantas 35S: THT heridas (verde) WT (azul) tras 24 horas después de ser heridas.

Los GLVs se liberan bajo diversas condiciones de estrés, como infecciones por patógenos bacterianos, fúngicos o ataques de herbívoros (Ul Hassan et al., 2015), así como respuesta a daños mecánicos como una herida (Bate & Rothstein, 1998). Nuestros resultados muestran que las plantas WT heridas, emiten GLVs de manera significativamente mayor que las plantas THT 7.3, aunque estas últimas también emiten estos compuestos en menor medida. Entre los GLVs detectados se incluyen el Z-3-hexenal (Figura 14A) y el 2,4-hexadienal (Figura 14B), así como el HB (Figura 14C) y cetonas como el 1-penten-3-ona (Figura 14D).

Estos resultados corroboran que las plantas responden a una herida mediante una liberación rápida de volátiles derivados de los ácidos grasos mediado por la vía LOX (Rasulov et al., 2019), lo que ocurre por el daño de las membranas celulares (Fall et al., 1999).

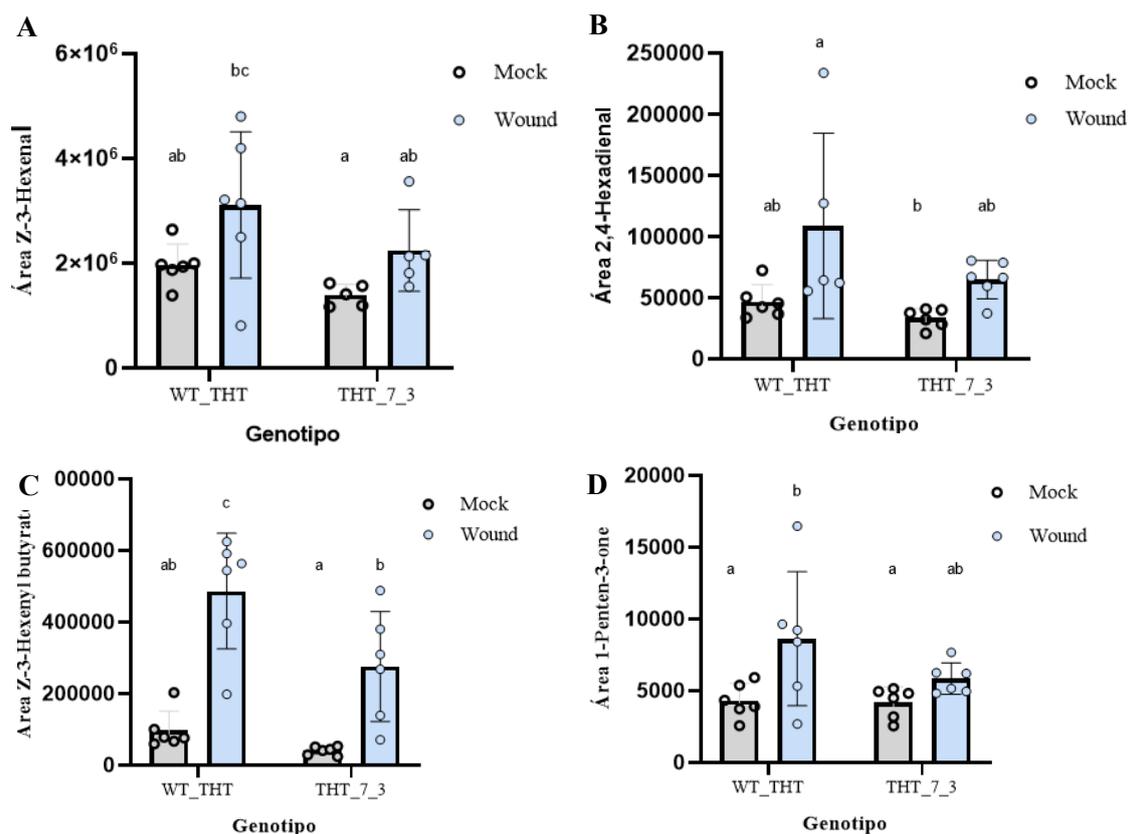


Figura 14 Emisión de GLVs de hojas de tomate WT (WT-THT) ante una herida mecánica. Emisión de (A) Z-3-Hexenal; (B) 2,4-Hexadienal; (C) Z-3-Hexenyl Butyrate; (D) 1-Penten-3-one. Cuantificación relativa del área del pico del cromatograma en el tiempo de retención correspondiente a los compuestos orgánicos volátiles descritos anteriormente, de plantas de plantas Heridas (Wound) y plantas sin herir (Mock). Las letras muestran la información de agrupación utilizando el método de Two way Anova con un nivel de significancia del 5% ($p\text{-value} < 0,05$)

Interesantemente, las plantas 35S: THT respondieron a la herida emitiendo una mayor concentración de compuestos aldehídos de cadena larga (C7-C10) específicos del genotipo. Entre estos compuestos se incluyen el 2-heptenal (Figura 15A), el *E-E*-2,4-heptadienal (Figura 15B), el *E*-2-Octenal (Figura 15C), el *E*-2-Decenal (Figura 15D), el 2H-Piran-2.6(3H)-diona (Figura 15E) y el 2-pentilfurano (Figura 15F).

Un estudio previo demostró que varios de estos volátiles, como el *E-E*-2,4-Heptadienal, el *E*-2-Octenal y el 2-pentilfurano, también fueron emitidos por plantas de tomate en respuesta a *Pseudomonas syringae* sugiriendo su alto potencial antimicrobiano (López-Gresa et al., 2017). Por ejemplo, el *E-E*-2,4-heptadienal ha demostrado tener un alto potencial antifúngico para controlar *Aspergillus flavus* en semillas de maní (Ma & Johnson, 2021). Además, la exposición *in vitro* del micelio de *Sclerotium rolfii* al 2-Octenal inhibió y eliminó completamente al hongo, sugiriéndolo su uso potencial en el control de hongos fitopatógenos del suelo (Liarzi et al., 2020).

También se ha estudiado el uso de estos compuestos como posibles bioinsecticidas. Por ejemplo, se ha demostrado que compuestos como el *E*-2-decenal y el *E*, *E*-2,4-decadienal afectan el desarrollo de los órganos reproductivos, así como la ovogénesis, la oviposición y el desarrollo embrionario de los escarabajos *Tenebrio molitor* (Walkowiak-Nowicka et al., 2023) Estos hallazgos destacan el potencial multifuncional de estos VOCs en la defensa de las plantas y su posible aplicación en la agricultura como agentes de bio control.

Algunos de estos VOCs, incluido el *E*-2-heptenal, el *E,E*-2,4-heptadienal, el *E*-2-octenal, también se han descrito como compuestos importantes en el sabor y el aroma del fruto del tomate, sugiriendo su importancia organoléptica (Garbowicz et al., 2018). Estos compuestos presentan una mayor inducción en los tomates maduros (Güler & Emre Şekerli, 2013) y son fuentes de intenso olor graso y aceitoso.

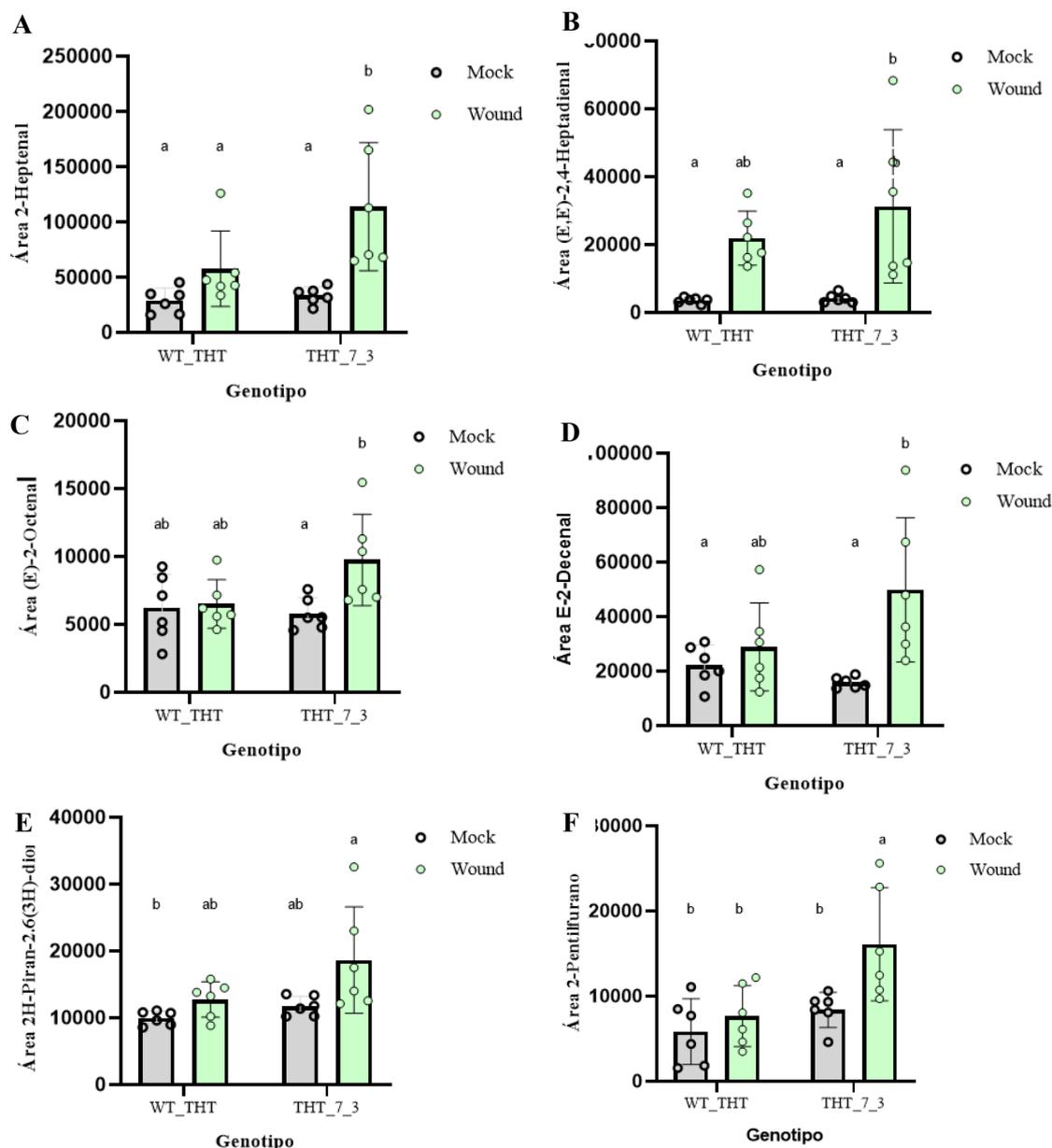


Figura 15 Emisión de VOCs de hojas de tomate 35S: THT (THT_7_3) ante una herida mecánica. Emisión de (A) 2-Heptenal, (B) (E, E)-2,4-Heptadienal, (C) 2H-Piran-2,6(3H)-diona, (D) 2-pentilfurano, (E) E-2-Octenal; (F) E-2-Decenal. Cuantificación relativa del área del pico del cromatograma en el tiempo de retención correspondiente a los compuestos orgánicos volátiles descritos anteriormente, de plantas de plantas Heridas (Wound) y plantas sin herir (Mock). Las letras muestran la información de agrupación utilizando el método de Two way Anova con un nivel de significancia del 5% (p -value < 0,05)

4.5 Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a herida en plantas de tomate 35S: *THT*.

A diferencia de la ruta de síntesis bien establecida para los compuestos volátiles de la familia de los GLVs de cadena corta C5 y C6 (Chen et al., 2004; Vancanneyt et al., 2001; Chen et al., 2004; Klee & Giovannoni, 2011), existe un conocimiento limitado sobre la vía de biosíntesis de los VOCs de cadena larga (C7-C10). Si bien la vía LOX es esencial para su producción, el mecanismo exacto aún no está elucidado.

Para investigar si la sobreexpresión de *THT* afecta la respuesta transcriptómica de las plantas ante una herida y las posibles vías de producción de VOCs derivados de ácidos grasos, se comparó la expresión de genes implicados en la vía LOX en las plantas transgénicas 35S: *THT* que presenta una inducción significativa del nivel de expresión relativa de *THT* y por tanto una mayor acumulación de HCAAs que su parental silvestre (WT) (Campos et al., 2014).

Se realizó un análisis mediante qRT-PCR 24 horas después de la herida (ver Material y Métodos) para evaluar las diferencias en los niveles de expresión relativa de varios genes implicados en la biosíntesis de VOCs derivados de ácidos grasos a través de la vía LOX, incluyendo *LIP1* y *TomLoxC*, así como un marcador de herida *TCI21*(Figura 16).

La expresión constitutiva de los genes *LIP1* y *TCI21*, fue menor en las plantas *THT* 7.3 en comparación con su parental WT (Figura 16 A y B). Sin embargo, tras la herida, la expresión relativa de ambos genes aumentó significativamente en ambas líneas. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *THT* podría conducir a una menor expresión basal de estos genes debido a un refuerzo de la pared celular, lo que podría estar relacionado con una menor necesidad de activar la vía LOX, sin embargo, esta ruta se activa al provocar una herida mecánica.

No se observó esta misma tendencia en la expresión relativa del gen *TomLoxC* (Figura 16 C), en donde las plantas transgénicas 35S: *THT* heridas mostraron una inducción significativa. La mayor expresión constitutiva del gen *TomLoxC* podría estar relacionada con su papel en la formación de compuestos C5 y C6 (Shen et al., 2014), lo cual respalda los resultados previamente observados en el volatiloema de ambas líneas, donde se observó la rápida emisión de estos volátiles al aplicar una herida.

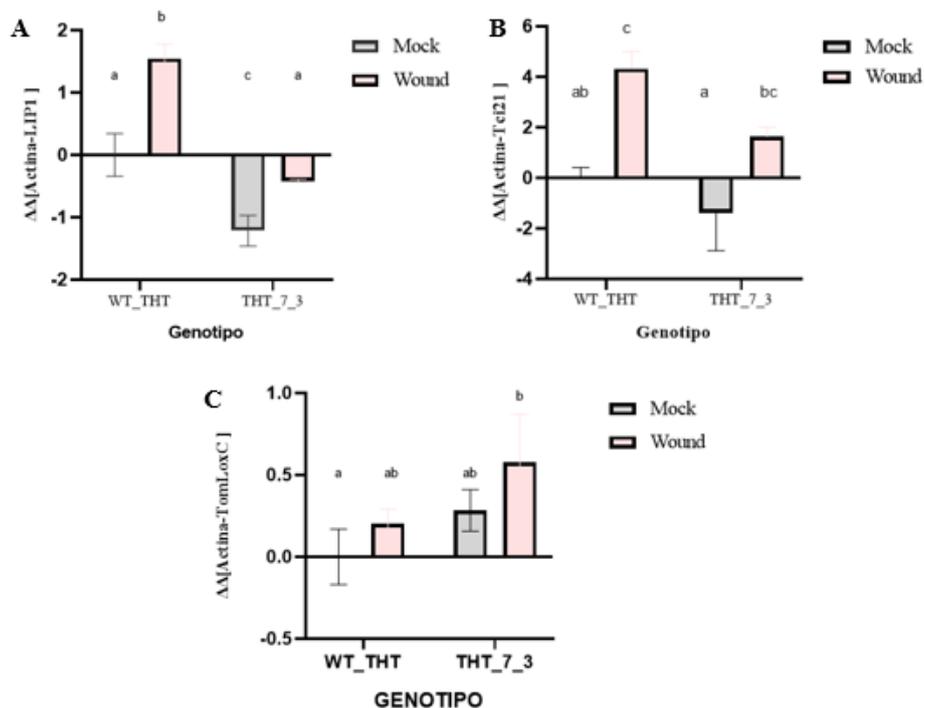


Figura 16 Expresión relativa de los genes *LIP1*, *TCI21* y *TomLoxC* en hojas de plantas transgénicas 35S: *THT*(*THT 7.3*) y su parental silvestre (*WT_THT*) después de 24 horas de la herida (*Wound*) y sin herir (*Mock*). Expresión relativa del gen A) *LIP1*, B) *TCI21* y C) *TomLoxC*. La expresión de mRNA en hojas de tomate para estos genes se analizó mediante qRT-PCR, utilizando el gen de la actina como referencia para normalizar los datos. Los controles no heridos (*WT_THT Mock*) se tomaron como valor de referencia. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres réplicas del experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test ANOVA con un valor *p* menor de 0.05 entre las distintas variedades de tomate.

4.6 Análisis de fluorescencia de callosa en respuesta a herida en plantas de tomate 35S: *THT*

Para evaluar la posible relación entre la sobreexpresión de *THT*, la formación de HCAAs y el refuerzo de la pared celular, se realizó un análisis de fluorescencia de callosa en las líneas transgénicas 35S: *THT* y su parental WT. Se realizaron heridas mecánicas en dos folíolos de las hojas de tomate y se observaron al microscopio UV Leika.

Los resultados mostraron una mayor intensidad de fluorescencia en las plantas transgénicas 35S: *THT* heridas (Figura 17 C y D) en comparación con su parental WT (Figura 17 A y B). Estos hallazgos respaldan los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio por Martín et al., (2021) y sugieren que la sobreexpresión de *THT* podría estar relacionada con el aumento en la síntesis de callosa tras una respuesta a un estrés biótico.

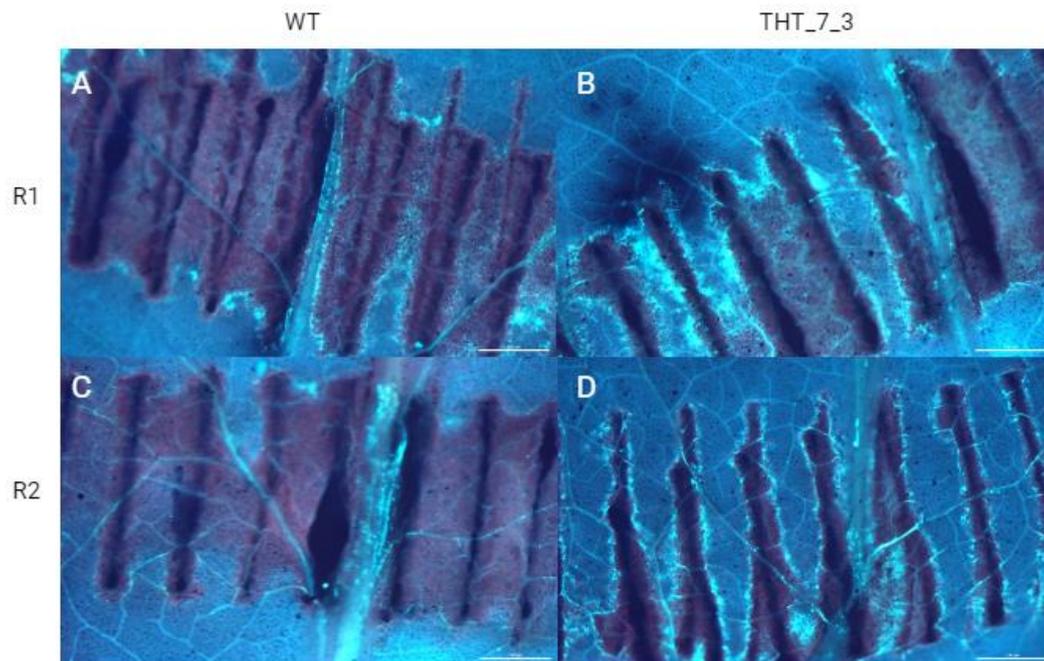


Figura 17 Tinción de azul de anilina de hoja de tomate de la línea *THT_7_3* y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. Las letras indican las muestras (A) WT- Réplica 1; (B) 35S: *THT* Réplica 1; (C) WT- Réplica 2; (D) 35S: *THT* Réplica 1

Específicamente en las plantas transgénicas 35S: *THT*, la intensidad de la fluorescencia de callosa alrededor de la zona lesionada era 4 veces mayor en comparación con su parental WT (Figura18). Estos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de *THT* no solo incrementa la acumulación de HCAAs, sino que también promueve una respuesta defensiva más robusta mediante la deposición de callosa, proporcionando así una barrera física más efectiva contra posibles patógenos.

Las HCAAs, presentes en todo el reino vegetal, se acumulan en diversos órganos, a menudo en altas concentraciones, especialmente en tejidos lesionados (Bassard et al., 2010). Estas HCAAs se transportan desde el citosol a diversas vesículas y luego a la membrana plasmática, facilitando su deposición en la pared celular (Macoy et al., 2015). Las poliaminas y las aminos aromáticas se enlazan con las resinas fenólicas de los ácidos hidroxicinámicos, formando moléculas de HCAAs que tienen la capacidad de conferir actividad antimicrobiana (Zeiss et al., 2021) y aumentar el grosor de la pared celular (Graça, 2010).

Por ejemplo, la sobreexpresión de *THT* mejoró la resistencia a *Pseudomonas syringae* debido al incremento de HCAAs como el p-cumaroiltiramina y la feruloiltiramina (Campos et al., 2014). Se ha demostrado que la aplicación exógena de HCAAs, como el cumaroiltiramina y cumaroiltriptamina inducen la deposición de callosa en *A. thaliana* en presencia de *Erwinia carotovora*, mejorando la resistencia de las plantas (Macoy et al., 2022). Por el contrario, el silenciamiento de enzimas claves en la formación de HCAAs, como *AtACT*, provocó una mayor susceptibilidad a *Alternaria brassicicola* (Muroi et al., 2009), mientras que la reducción de *TaACT* resultó en una disminución del contenido de p-cumaroylagmatina y una mayor susceptibilidad a *Fusarium graminearum* (Kage et al., 2017).

En conclusión, nuestros resultados indican que la sobreexpresión de *THT* en plantas de tomate, mejora la respuesta de defensa mediante la acumulación de callosa y la producción de HCAAs, fortaleciendo la pared celular y limitando la propagación de patógenos.

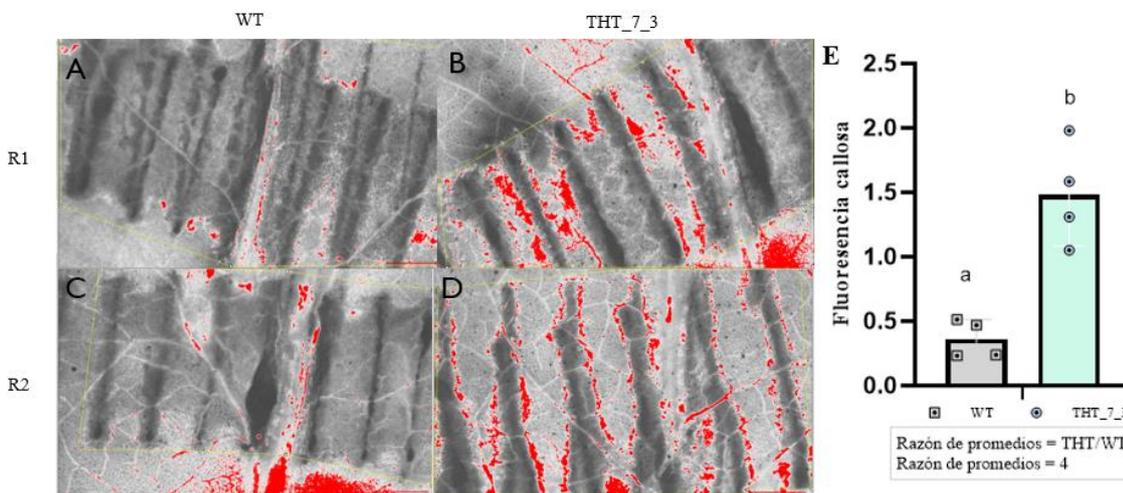


Figura 18 Fluorescencia de callosa teñida con azul de anilina, medida con ImageJ de hoja de tomate de la línea THT_7_3 y su parental, heridas con pinzas 24 horas antes de su recogida. (A) WT-R1; (B) THT_7_3-R1; (C) WT-R2; (D) THT_7_3-R2; (E) Cuantificación fluorescencia de callosa en dos hojas de cada línea.

En conjunto, los resultados de este estudio revelan que la sobreexpresión de *THT* modula la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en las plantas de tomate tras realizar una herida mecánica. A diferencia de las plantas WT, que liberaron principalmente volátiles de hoja verde, las plantas 35S: *THT* emitieron principalmente aldehídos y alcoholes de cadena larga (C7-C10) como el *E*-2-Heptenal, el *E-E*-2,4-heptadienal o el *E*-2-octenal. Aunque se conoce que estos VOCs de cadena larga se derivan de los ácidos grasos linolénico y linoleico a través de la vía LOX, aún existen vacíos de conocimiento sobre las enzimas específicas involucradas en su síntesis. La elucidación de estas rutas biosintéticas permitiría comprender mejor los mecanismos por los cuales la sobreexpresión de *THT* modula la producción de estos compuestos y su potencial en la defensa vegetal.

Además, la sobreexpresión de *THT* conduce a una mayor acumulación de callosa en las zonas heridas de las hojas de tomate en comparación con su fondo genético. Esta acumulación está relacionada con la mayor concentración de HCAAs en las plantas *THT*, componentes clave en el refuerzo de la pared celular. La mayor disponibilidad de HCAAs y la consecuente deposición de callosa fortalecen la pared celular, limitando la propagación de patógenos y mejorando la respuesta defensiva de las plantas. Estos resultados destacan el papel potencial de *THT* en la regulación de la síntesis de callosa y la formación de HCAAs, subrayando su importancia en la defensa de las plantas frente a un estrés biótico.

Perspectivas Futuras

En la naturaleza, las plantas están expuestas a una serie de desafíos en su entorno, incluyendo el ataque de herbívoros, patógenos y condiciones ambientales adversas. Para sobrevivir, han desarrollado una serie de mecanismos de defensa. Es así como la vía de las lipoxigenasas es uno de los mecanismos más importantes al facilitar la activación de genes de defensa que inducen la liberación de JA y GLVs. Sin embargo, también podemos observar que además de estos volátiles se pueden inducir otros compuestos de cadena más larga y que presentan un alto potencial antifúngico y bioinsecticida, como los aldehídos y alcoholes C7-C10 como el *E*-2-Heptenal, el *E-E*-2,4-heptadienal o el *E*-2-octenal identificados en las plantas que sobre expresan el gen *THT*.

Profundizar en el estudio de las posibles glicosilaciones de los VOCs para ser emitidos a la atmósfera también dará luz a los resultados obtenidos con las plantas transgénicas *RNAi_Twi1* y entender su papel en la respuesta a herida.

Nuevas investigaciones son necesarias para comprender la interacción de estos volátiles con la respuesta defensiva de las plantas. Comprender estos mecanismos permitirá implementar nuevas estrategias en la defensa de las plantas contra agentes patógenos, herbívoros y otras amenazas, así como potenciar su aplicación como biopesticidas o bioestimulantes naturales.

5 CONCLUSIONES

1. El silenciamiento génico de *Twi1* suprime parcialmente la respuesta a la herida alterando la emisión de VOCs, sugiriendo que la glicosilación de los volátiles emitidos tras este estrés parece ser un paso clave en la respuesta a la herida.
2. La línea *RNAi_Twi 1* acumula más callosa en respuesta a herida que su parental, indicando que este gen está implicado en la formación de esta barrera defensiva.
3. Las plantas transgénicas *35S: THT* presentan un perfil único de emisión de VOCs en respuesta a la herida, caracterizado por una mayor abundancia de aldehídos y alcoholes de cadena larga (C7-C10).
4. La línea *35S: THT* acumula cuatro veces más callosa en respuesta a la herida que su parental, lo que podría estar relacionado con la mayor disponibilidad de amidas derivadas del ácido hidrocínámico (HCAAs).

6 BIBLIOGRA

- Ameys, M., Van Meulebroek, L., Meuninck, B., Vanhaecke, L., Smagghe, G., Haesaert, G., & Audenaert, K. (2020). Metabolomics Reveal Induction of ROS Production and Glycosylation Events in Wheat Upon Exposure to the Green Leaf Volatile Z-3-Hexenyl Acetate. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.596271>
- Avesani, S., Lazazzara, V., Robatscher, P., Oberhuber, M., & Perazzolli, M. (2023). Volatile linalool activates grapevine resistance against downy mildew with changes in the leaf metabolome. *Current Plant Biology*, 35–36, 100298. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2023.100298>
- Baldwin, I. T., Halitschke, R., Paschold, A., Von Dahl, C. C., & Preston, C. A. (2006). Volatile Signaling in Plant-Plant Interactions: “Talking Trees” in the Genomics Era. *Science*, 311(5762), 812–815. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1118446>
- Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., & Werck-Reichhart, D. (2010). Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*, 71(16), 1808–1824. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2010.08.003>
- Bate, N. J., & Rothstein, S. J. (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *The Plant Journal*, 16(5), 561–569. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1998.00324.X>
- Bhambhani, S., Kondhare, K. R., & Giri, A. P. (2021). Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules*, 26(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26113374>
- Bouwmeester, H., Schuurink, R. C., Bleeker, P. M., & Schiestl, F. (2019). The role of volatiles in plant communication. *The Plant Journal*, 100(5), 892. <https://doi.org/10.1111/TPJ.14496>
- Cagliero, C., Mastellone, G., Marengo, A., Bicchi, C., Sgorbini, B., & Rubiolo, P. (2021). Analytical strategies for in-vivo evaluation of plant volatile emissions - A review. *analytica chimica acta*, 1147, 240–258. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.11.029>
- 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., López-Gresa, M. P., Fuertes, D., Bellés, J. M., Rodrigo, I., & Lisón, P. (2019). Tomato glycosyltransferase *Twi1* plays a role in flavonoid glycosylation and defence against virus. *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2063-9>
- Campos, M. L., Kang, J. H., & Howe, G. A. (2014). Jasmonate-Triggered Plant Immunity. *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 657–675. <https://doi.org/10.1007/S10886-014-0468-3/TABLES/2>

- Cesarino, I., Eudes, A., Urbanowicz, B., & Xie, M. (2022). Editorial: Phenylpropanoid Systems Biology and Biotechnology. *Frontiers in Plant Science*, 13, 866164. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.866164>
- Chatzivasileiou, A. O., Ward, V., Edgar, S. M. B., & Stephanopoulos, G. (2019). Two-step pathway for isoprenoid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(2), 506–511. https://doi.org/10.1073/PNAS.1812935116/SUPPL_FILE/PNAS.1812935116.SD01.XLSX
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z., & Grierson, D. (2004). Identification of a Specific Isoform of Tomato Lipoxygenase (TomloxC) Involved in the Generation of Fatty Acid-Derived Flavor Compounds. *Plant Physiology*, 136(1), 2641. <https://doi.org/10.1104/PP.104.041608>
- Dangl, J. L., & McDowell, J. M. (2006). Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8575–8576. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0603183103/ASSET/3689287C-8A71-4A38-8279-34F1CBE71205/ASSETS/PNAS.0603183103.FP.PNG>
- Eulgem, T. (2000). Plant wound responses. *Genome Biology* 2000 1:2, 1(2), 1–4. <https://doi.org/10.1186/GB-2000-1-2-REPORTS0061>
- Esquinas-Alcázar, J., & Nuez, F. (1995). *El cultivo de Tomate. Capítulo 1: Situación taxonómica, domesticación y difusión*. Madrid: Ediciones Mundi Prensa.
- Facchini, P. J., Hagel, J., & Zulak, K. G. (2002). Hydroxycinnamic acid amide metabolism: Physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany*, 80(6), 577–589. <https://doi.org/10.1139/B02-065>
- Fall, R., Karl, T., Hansel, A., Jordan, A., & Lindinger, W. (1999). Volatile organic compounds emitted after leaf wounding: On-line analysis by proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 104(D13), 15963–15974. <https://doi.org/10.1029/1999JD900144>
- Farmer, E. E., & Ryan, C. A. (1992). GLVs. *The Plant Cell*, 4(2), 129. <https://doi.org/10.1105/TPC.4.2.129>
- FAOSTAT. (2022). *Cantidades de producción de tomates frescos por país*. Obtenido de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL/visualize>
- Fonseca Vasco, L., & Sans, G. (2015). *Manual Tomate*. Bogota: Cámara de Comercio de Bogotá.
- J. Fornaris, G. (2007). *Conjunto Tecnológico para la Producción de Tomate de ensalda: Características de la planta*. Puerto rico: Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico. EEE/UPR.

- Gachon, C. M. M., Langlois-Meurinne, M., & Saindrenan, P. (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science*, *10*(11), 542–549. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2005.09.007>
- Garbowicz, K., Liu, Z., Alseekh, S., Tieman, D., Taylor, M., Kuhalskaya, A., Ofner, I., Zamir, D., Klee, H. J., Fernie, A. R., & Brotman, Y. (2018). Quantitative Trait Loci Analysis Identifies a Prominent Gene Involved in the Production of Fatty Acid-Derived Flavor Volatiles in Tomato. *Molecular Plant*, *11*(9), 1147–1165. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2018.06.003/ATTACHMENT/9C2A0C31-3C96-4B09-BCB2-73CCEE0F23A/MMC10.XLSX>
- Güler, Z., & Emre Şekerli, Y. (2013). Accepted (Kabul Tarihi): 30.06. In *Z. Guler* +90 (Vol. 326). <http://www.academicfoodjournal.com>
- Halitschke, R., Stenberg, J. A., Kessler, D., Kessler, A., & Baldwin, I. T. (2008). Shared signals - “Alarm calls” from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. *Ecology Letters*, *11*(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01123.x>
- Hong, Z., Zhang, Z., Olson, J. M., & Verma, D. P. S. (2001). A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. *The Plant Cell*, *13*(4), 769–779. <https://doi.org/10.1105/TPC.13.4.769>
- Kage, U., Karre, S., Kushalappa, A. C., & McCartney, C. (2017). Identification and characterization of a fusarium head blight resistance gene TaACT in wheat QTL-2DL. *Plant Biotechnology Journal*, *15*(4), 447. <https://doi.org/10.1111/PBI.12641>
- Langlois-Meurinne, M., Gachon, C. M. M., & Saindrenan, P. (2005). Pathogen-Responsive Expression of Glycosyltransferase Genes UGT73B3 and UGT73B5 Is Necessary for Resistance to *Pseudomonas syringae* pv tomato in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *139*(4), 1890–1901. <https://doi.org/10.1104/PP.105.067223>
- Leo, J. Â., Rojo, E., & Sa Â Nchez-Serrano, J. Â. J. (2001). *Wound signalling in plants*.
- Liarzi, O., Benichis, M., Gamliel, A., & Ezra, D. (2020). trans-2-Octenal, a single compound of a fungal origin, controls *Sclerotium rolfsii*, both in vitro and in soil. *Pest Management Science*, *76*(6), 2068–2071. <https://doi.org/10.1002/PS.5744>
- Liavonchanka, A., & Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, *163*(3), 348–357. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2005.11.006>
- Lima, R. B., Salvador, V. H., Dos Santos, W. D., Bubna, G. A., Finger-Teixeira, A., Soares, A. R., Marchiosi, R., Ferrarese, M. D. L. L., & Ferrarese-Filho, O. (2013). Enhanced lignin monomer production caused by cinnamic Acid and its hydroxylated derivatives inhibits soybean root growth. *PloS One*, *8*(12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0080542>
- Lisón, P., Rodrigo, I., & Conejero, V. (2006). A Novel Function for the Cathepsin D Inhibitor in Tomato. *Plant Physiology*, *142*(3), 1329. <https://doi.org/10.1104/PP.106.086587>

- Liu, S., Jiang, J., Ma, Z., Xiao, M., Yang, L., Tian, B., Yu, Y., Bi, C., Fang, A., & Yang, Y. (2022). The Role of Hydroxycinnamic Acid Amide Pathway in Plant Immunity. *Frontiers in Plant Science*, 13, 922119. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.922119/BIBTEX>
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Campos, L., Rodrigo, I., Rambla, J. L., Granell, A., Conejero, V., & Bellés, J. M. (2017). A non-targeted metabolomics approach unravels the VOCs associated with the tomato immune response against *Pseudomonas syringae*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 278706. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01188/BIBTEX>
- López-Gresa, M. P., Payá, C., Ozáez, M., Rodrigo, I., Conejero, V., Klee, H., Bellés, J. M., & Lisón, P. (2018). A New Role For Green Leaf Volatile Esters in Tomato Stomatal Defense Against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01855>
- Lup, S. D., Tian, X., Xu, J., & Pérez-Pérez, J. M. (2016). Wound signaling of regenerative cell reprogramming. In *Plant Science* (Vol. 250, pp. 178–187). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.012>
- Ma, W., & Johnson, E. T. (2021). Natural flavour (E,E)-2,4-heptadienal as a potential fumigant for control of *Aspergillus flavus* in stored peanut seeds: Finding new antifungal agents based on preservative sorbic acid. *Food Control*, 124, 107938. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.107938>
- Macoy, D. M. J., Uddin, S., Ahn, G., Peseth, S., Ryu, G. R., Cha, J. Y., Lee, J. Y., Bae, D., Paek, S. M., Chung, H. J., Mackey, D., Lee, S. Y., Kim, W. Y., & Kim, M. G. (2022). Effect of Hydroxycinnamic Acid Amides, Coumaroyl Tyramine and Coumaroyl Tryptamine on Biotic Stress Response in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 65(2), 145–155. <https://doi.org/10.1007/S12374-021-09341-2/FIGURES/7>
- Maffei, M. E. (2010). Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76(4), 612–631. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.003>
- Mahawer, S. K., Arya, S., Kandpal, T., Kumar, R., Prakash, O., Chitara, M. K., & Koli, P. (2022). Plant defense systems: Mechanism of self-protection by plants against pathogens. In *Plant Protection: From Chemicals to Biologicals* (pp. 115–140). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110771558-006>
- Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T., & Feussner, I. (2006). Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, 67(7), 649–657. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2006.01.006>
- Monaghan, J., & Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 349–357. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2012.05.006>
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., & Nishioka, T. (2009a). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen

- infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 230(3), 517–527. <https://doi.org/10.1007/S00425-009-0960-0>
- Nakamura, S., & Hatanaka, A. (2002). Green-Leaf-Derived C6-Aroma Compounds with Potent Antibacterial Action That Act on Both Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7639–7644. <https://doi.org/10.1021/JF025808C>
- Nawrocka, J., Szymczak, K., Skwarek-Fadecka, M., & Malolepsza, U. (2023). Toward the Analysis of Volatile Organic Compounds from Tomato Plants (*Solanum lycopersicum* L.) Treated with *Trichoderma virens* or/and *Botrytis cinerea*. *Cells*, 12(9), 1271. <https://doi.org/10.3390/CELLS12091271/S1>
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/IJMS22115710>
- O'Donnell, P. J., Truesdale, M. R., Calvert, C. M., Dorans, A., Roberts, M. R., & Bowles, D. J. (1998). A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *The Plant Journal*, 14(1), 137–142. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1998.00110.X>
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., & Ryan, C. A. (1991). A Polypeptide from Tomato Leaves Induces Wound-Inducible Proteinase Inhibitor Proteins. *Science*, 253(5022), 895–897. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.253.5022.895>
- Peralta, I. E., Spooner, D. M., Peralta, R., & Spooner, D. E. M. (2000). KURTZIANA .. , Classification of wild tomatoes: a review. In *Torno* (Vol. 28).
- Portillo-Estrada, M., Okereke, C. N., Jiang, Y., Talts, E., Kaurilind, E., & Niinemets, Ü. (2021). Wounding-Induced VOC Emissions in Five Tropical Agricultural Species. *Molecules*, 26(9), 2602. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26092602>
- Pott, D. M., Osorio, S., & Vallarino, J. G. (2019). From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10, 454686. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00835/BIBTEX>
- Rasulov, B., Talts, E., & Niinemets, Ü. (2019). A novel approach for real-time monitoring of leaf wounding responses demonstrates unprecedentedly fast and high emissions of volatiles from cut leaves. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 283, 256. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2019.03.006>
- Reshi, Z. A., Ahmad, W., Lukatkin, A. S., & Javed, S. Bin. (2023). From Nature to Lab: A Review of Secondary Metabolite Biosynthetic Pathways, Environmental Influences, and In Vitro Approaches. *Metabolites*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/METABO13080895>
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., & Farmer, E. E. (2000). Differential Gene Expression in Response to Mechanical Wounding and Insect Feeding in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(5), 707. <https://doi.org/10.1105/TPC.12.5.707>

- Samuel, A., Colmena, Q., & En Biotecnología, G. (2021). *Caracterización fenotípica y molecular del mutante insercional de tomate 1600-etmm*.
- Sanmartín, L. Z. (n.d.). *Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con Pseudomonas syringae pv. tomato*.
- Shahidi, F., & Young Oh, W. (2020). Lipid-derived flavor and off-flavor of traditional and functional foods: an overview. *Journal of Food Bioactives*, 2637-8779
- Scheible, W. R., & Pauly, M. (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 285–295. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2004.03.006>
- Shen, J., Tieman, D., Jones, J. B., Taylor, M. G., Schmelz, E., Huffaker, A., Bies, D., Chen, K., & Klee, H. J. (2014). A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 419. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT382>
- Sugimoto, K., Iijima, Y., Takabayashi, J., & Matsui, K. (2021). Processing of Airborne Green Leaf Volatiles for Their Glycosylation in the Exposed Plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 721572. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.721572/BIBTEX>
- Sugimoto, K., Matsui, K., & Takabayashi, J. (2015). Conversion of volatile alcohols into their glucosides in Arabidopsis. *Communicative & Integrative Biology*, 8(1). <https://doi.org/10.4161/19420889.2014.992731>
- Tárraga, S., Lisón, P., López-Gresa, M. P., Torres, C., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & Conejero, V. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel tomato xylosyltransferase specific for gentisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 61(15), 4325–4338. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERQ234>
- Teoh, E. S. (2016). Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia*, 59–73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5
- ul Hassan, M. N., Zainal, Z., & Ismail, I. (2015). Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnology Journal*, 13(6), 727–739. <https://doi.org/10.1111/PBI.12368>
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M., Ortego, F., Castañera, P., & Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8139. <https://doi.org/10.1073/PNAS.141079498>
- Vega-Muñoz, I., Duran-Flores, D., Fernández-Fernández, Á. D., Heyman, J., Ritter, A., & Stael, S. (2020). Breaking Bad News: Dynamic Molecular Mechanisms of Wound Response in Plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.610445>
- Viswanath, K. K., Varakumar, P., Pamuru, R. R., Basha, S. J., Mehta, S., & Rao, A. D. (2020). Plant Lipoxygenases and Their Role in Plant Physiology. In *Journal of Plant*

- Biology* (Vol. 63, Issue 2, pp. 83–95). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09241-x>
- Vivaldo, G., Masi, E., Taiti, C., Caldarelli, G., & Mancuso, S. (2017). The network of plants volatile organic compounds. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10975-x>
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. In *Molecular Plant* (Vol. 3, Issue 1, pp. 2–20). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Voigt, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*, 5(APR), 86993. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00168/BIBTEX>
- Von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Keßler, T., Schmitt-Kopplin, P., & Schäffner, A. R. (2011). The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *The Plant Cell*, 23(11), 4124–4145. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.088443>
- Walkowiak-Nowicka, K., Mirek, J., Chowański, S., Sobkowiak, R., & Słocińska, M. (2023). Plant secondary metabolites as potential bioinsecticides? Study of the effects of plant-derived volatile organic compounds on the reproduction and behaviour of the pest beetle *Tenebrio molitor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 257, 114951. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2023.114951>
- Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2021). Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052393>
- 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>
- Zeiss, D. R., Piater, L. A., & Dubery, I. A. (2021). Hydroxycinnamate Amides: Intriguing Conjugates of Plant Protective Metabolites. *Trends in Plant Science*, 26(2), 184–195. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2020.09.011>
- Zhang, wenjin, chang, likun, cao, ye, wang, sheng, lyu, chaogeng, kang, chuanzhi, zhou, li, Huang, luqi, & Guo, L. (2024). Glycosylation of plant secondary metabolites: the regulation from chaos to harmony. *Authorea Preprints*. <https://doi.org/10.22541/AU.170665539.90584931/V1>
- Zhang, W., Wang, S., Yang, J., Kang, C., Huang, L., & Guo, L. (2022). Glycosylation of plant secondary metabolites: Regulating from chaos to harmony. *Environmental and Experimental Botany*, 194, 104703. <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2021.104703>