



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio del papel de THT y TWi en la longevidad de las
semillas y caracterización de respuesta defensiva mediada
por serotonina y melatonina en plantas de tomate

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Rodríguez Fuentes, Miguel

Tutor/a: López Gresa, María Pilar

Director/a Experimental: Grech Hernández, Carmen

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

Resumen

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial, con una amplia diversidad genética que ha permitido su adaptación a diferentes condiciones climáticas y preferencias de consumo. Se trata de un cultivo abundante en compuestos como licopeno, vitamina C y diversos compuestos fenólicos. Su producción se enfrenta a desafíos importantes, tanto bióticos como abióticos. Entre los de tipo biótico se encuentran los producidos por enfermedades y plagas que pueden ser causadas por viroides, virus, bacterias, hongos o insectos. En respuesta a estos estreses de tipo biótico, se ha descrito que las plantas de tomate acumulan una mayor cantidad de compuestos fenólicos, entre los que se encuentran las amidas derivadas del ácido hidroxicinámico (HCAAs) y los flavonoides. Por su parte, se ha descrito que derivados del triptófano como la serotonina y melatonina confieren tolerancia a estreses de tipo abiótico (revisado en Kaur et al. 2015), aunque su posible papel frente a estreses bióticos en tomate no ha sido descrito hasta la fecha.

El último paso de la biosíntesis de las HCAAs es catalizado por el enzima tiramina hidroxicinamoil transferasa (*THT*). Por su parte, la mayoría de los flavonoides acumulan en planta en forma de glicoconjugados, por la acción de glicosiltransferasas. En particular, la glicosiltransferasa *Twil* muestra actividad *in vitro* frente a los flavonoides quercetina y kaempferol. Por su parte, la triptófano descarboxilasa de tomate *SITDC2* juega un papel fundamental en la biosíntesis de serotonina (Tsunoda et al., 2021).

Recientemente, se ha descrito que los compuestos fenólicos juegan un papel muy importante en la longevidad de las semillas de *Arabidopsis thaliana* (Niñoles et al., 2023). Con el fin de estudiar el papel de las HCAAs y los flavonoides en la longevidad de las semillas de tomate, en este trabajo se han caracterizado plantas transgénicas de tomate generadas en nuestro laboratorio en fondo MoneyMaker (MM), con niveles alterados de estos compuestos fenólicos. Específicamente, se han empleado plantas que sobreexpresan el gen *THT* (*35S:THT*; Campos et al., 2014) y plantas que silencian el gen *Twil* (*RNAi_Twil*; Campos et al., 2019). Para ello, se han analizado tanto la degradación de las semillas, mediante una tinción con tetrazolio, como la tasa de germinación de las semillas envejecidas a distintos tiempos de tratamiento tras la aplicación de un tratamiento de envejecimiento acelerado a las semillas de las líneas transgénicas y su fondo genético MM. También, se han realizado comparaciones fisiológicas, evaluando el crecimiento y desarrollo de las plantas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por otra parte, y con el fin de estudiar el posible papel de la serotonina y la melatonina en la respuesta defensiva de plantas de tomate, se ha analizado la expresión diferencial mediante RTqPCR de los genes implicados en la ruta biosintética de las moléculas de serotonina, tales como *SITDC2*, como respuesta a diferentes tipos de estreses tanto bióticos, incluyendo herida e infecciones bacterianas y virales, como abióticos sometiénolas a altas temperaturas. Además, se ha evaluado la efectividad de los tratamientos exógenos con serotonina o melatonina sobre la actividad defensiva.

Los resultados de este Trabajo de Fin de Grado destacan la importancia de los HCAAs y flavonoides en el desarrollo de raíces, y el papel defensivo de la serotonina y melatonina en situaciones de estrés frente patógenos y condiciones adversas. Las plantas transgénicas *35S:THT*, con mayor contenido de HCAAs, han demostrado tener raíces principales más cortas y menos raíces laterales, mientras que las plantas *RNAi_TW1*, con niveles

alterados de flavonoides, muestran una mayor longitud de la raíz principal y una longevidad de semilla reducida, indicando que los flavonoides son de gran relevancia en el desarrollo de raíz y semilla. La expresión del gen *SITDC2* se ha visto afectada bajo diversas condiciones de estrés, evidenciando el papel de la serotonina y melatonina en la adaptación y defensa. Asimismo, tratamientos con melatonina generan resistencia bacteriana, demostrando su eficacia defensiva en plantas de tomate. Estos hallazgos podrían ayudar a desarrollar estrategias para mejorar la resistencia y rendimiento de los cultivos de tomate.

Resum

El tomàquet (*Solanum lycopersicum*) és un cultiu de gran importància econòmica a nivell mundial, amb una àmplia diversitat genètica que ha permès la seua adaptació a diferents condicions climàtiques i preferències de consum. Es tracta d'un cultiu abundant en compostos com el licopè, vitamina C i diversos compostos fenòlics. La seua producció s'enfronta a reptes importants, tant biòtics com abiòtics. Entre els de tipus biòtic es troben els produïts per plagues i malalties que poden ser causades per viroides, virus, bacteris, fongs o insectes. En resposta a aquests estressors de tipus biòtic, s'ha descrit que les plantes de tomàquet acumulen una major quantitat de compostos fenòlics, entre els quals es troben les amides derivades de l'àcid hidroxicinàmic (HCAAs) i els flavonoides. D'altra banda, els derivats del triptòfan, com la serotonina i la melatonina, han demostrat conferir tolerància a estressors de tipus abiòtic (revisat en Kaur et al. 2015), encara que el seu possible paper davant d'estressors biòtics en tomàquet no ha estat descrit fins a la data.

El darrer pas de la biosíntesi de les HCAAs és dut a terme per l'enzim tiramina hidroxicinamoil transferasa (*THT*). D'altra banda, la majoria dels flavonoides s'acumulen en les plantes en forma de glicoconjugats, per l'acció de glicosiltransferases. En particular, la glicosiltransferasa *Twil* mostra activitat in vitro davant dels flavonoides quercetina i kaempferol. D'altra banda, la triptòfan descarboxilasa de tomàquet *SITDC2* juga un paper fonamental en la biosíntesi de serotonina (Tsunoda et al., 2021).

Recentment, s'ha descrit que els compostos fenòlics juguen un paper molt important en la longevitat de les llavors d'*Arabidopsis thaliana* (Niñoles et al., 2023). Amb la finalitat d'estudiar el paper de les HCAAs i els flavonoides en la longevitat de les llavors de tomàquet, en aquest treball s'han caracteritzat plantes generades en el nostre laboratori en el fons genètic MoneyMaker (MM), amb nivells alterats d'aquests compostos fenòlics. Específicament, s'han utilitzat plantes que sobreexpressen el gen *THT* (*35S:THT*; Campos et al., 2014) i plantes que silencien el gen *Twil* (*RNAi_Twil*; Campos et al., 2019). Per a això, s'han analitzat tant la degradació de les llavors, mitjançant una tinció amb tetrazoli, com la taxa de germinació de les llavors envellides a diferents temps de tractament després d'aplicar un tractament d'envelliment accelerat a les llavors de les línies transgèniques i el control MM. També, s'han realitzat comparacions fisiològiques, avaluant el creixement i desenvolupament de les plantes tant in vitro com in vivo.

D'altra banda, i amb la finalitat d'estudiar el possible paper de la serotonina i la melatonina en la resposta defensiva de les plantes de tomàquet, s'ha analitzat l'expressió diferencial mitjançant RT-qPCR dels gens implicats en la ruta biosintètica de les molècules de serotonina, com ara *SITDC2*, com a resposta a diferents tipus d'estressors tant biòtics,

inclouent ferides i infeccions bacterianes i virals, com abiòtics, sotmetent-les a altes temperatures. A més, s'ha avaluat l'eficàcia del tractament amb serotonina i melatonina exògenes sobre l'activitat defensiva.

Els resultats d'aquest Treball de Fi de Grau destaquen la importància dels HCAAs i flavonoides en el desenvolupament d'arrels, i el paper defensiu de la serotonina i melatonina en situacions d'estrès front patògens i condicions adverses. Les plantes transgèniques *35S:THT*, amb major contingut d'HCAAs, han demostrat tindre arrels principals més curtes i menys arrels laterals, mentre que les plantes *RNAi_TW1*, amb nivells alterats de flavonoides, mostren una major longitud de l'arrel principal i una longevitat de llavor reduïda, indicant que els flavonoides són de gran rellevància en el desenvolupament d'arrel i llavor. L'expressió del gen *SITDC2* s'ha vist afectada baix diverses condicions d'estrès, evidenciant el paper de la serotonina i melatonina en l'adaptació i defensa. Així mateix, tractaments amb melatonina generen resistència bacteriana, demostrant la seua eficàcia defensiva en plantes de tomaca. Aquests descobriments podrien ajudar a desenvolupar estratègies per a millorar la resistència i el rendiment dels cultius de tomaca.

Abstract

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is a crop of great economic importance worldwide, with a wide genetic diversity that has allowed its adaptation to different climatic conditions and consumer preferences. It is abundant in compounds such as lycopene, vitamin C, and various phenolic compounds. Its production faces significant challenges, both biotic and abiotic. Among the biotic challenges are those caused by pests and diseases that can be caused by viroids, viruses, bacteria, fungi, or insects. In response to these biotic stresses, it has been described that tomato plants accumulate a greater amount of phenolic compounds, including hydroxycinnamic acid-derived amides (HCAAs) and flavonoids. Meanwhile, derivatives of tryptophan, such as serotonin and melatonin, have been described to confer tolerance to abiotic stresses (reviewed in Kaur et al., 2015), although their possible role against biotic stresses in tomatoes has not been described to date.

The final step of HCAAs biosynthesis is carried out by the enzyme tyramine hydroxycinnamoyl transferase (*THT*). On the other hand, most flavonoids accumulate in plants in the form of glycoconjugates, through the action of glycosyltransferases. In particular, the glycosyltransferase *Twil* shows in vitro activity against the flavonoids quercetin and kaempferol. Meanwhile, tomato tryptophan decarboxylase *SITDC2* plays a fundamental role in serotonin biosynthesis (Tsunoda et al., 2021).

Recently, it has been described that phenolic compounds play a very important role in the longevity of *Arabidopsis thaliana* seeds (Niñoles et al., 2023). In order to study the role of HCAAs and flavonoids in the longevity of tomato seeds, this work has characterized plants generated in our laboratory in the MoneyMaker (MM) background, with altered levels of these phenolic compounds. Specifically, plants overexpressing the *THT* gene (35S; Campos et al., 2014) and plants silencing the *Twil* gene (*RNAi_Twil*; Campos et al., 2019) were used. For this purpose, both seed degradation, through staining with

tetrazolium, and the germination rate of aged seeds at different treatment times after applying an accelerated aging treatment to the seeds of the transgenic lines and MM control were analyzed. Furthermore, physiological comparisons were made, evaluating plant growth and development both in vitro and in vivo.

On the other hand, in order to study the possible role of serotonin and melatonin in the defensive response of tomato plants, the differential expression was analyzed via RT-qPCR of genes involved in the biosynthetic pathway of serotonin molecules, such as *SITDC2*, as a response to different types of stresses, both biotic, including wound and bacterial and viral infections, and abiotic, subjecting them to high temperatures. Additionally, the effectiveness of treatment with exogenous serotonin and melatonin on defensive activity was evaluated. Our results could contribute to the development of strategies to increase the resistance and yield of tomato crops against biotic and abiotic stresses, thus contributing to ensuring the availability and quality of this important food source.

The results of this Bachelor's Thesis highlight the importance of HCAAs and flavonoids in root development, as well as the defensive role of serotonin and melatonin under stress conditions involving pathogens and adverse environments. The transgenic *35S:THT* plants, with higher HCAA content, have demonstrated shorter primary roots and fewer lateral roots, while RNAi_TW1 plants, with altered flavonoid levels, show greater primary root length and reduced seed longevity, indicating that flavonoids play a significant role in root and seed development. The expression of the *SITDC2* gene has been affected under various stress conditions, demonstrating the role of serotonin and melatonin in adaptation and defense. Furthermore, melatonin treatments induce bacterial resistance, showcasing its defensive efficacy in tomato plants. These findings could help develop strategies to improve the resistance and yield of tomato crops.

Anejo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030.

Grado de relación del presente TFG con los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) de la agenda 2030:

	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza		X		
ODS 2. Hambre cero	X			
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables		X		
ODS 13. Acción por el clima	X			
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres		X		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

La modificación genética es una estrategia que permite la mejora de cultivos de forma muy dirigida, con la finalidad de generar cultivos más productivos, mejorar el contenido o eliminar compuestos indeseables, generar resistencia a estreses bióticos o mayor tolerancia a estrés abiótico. Como resultado se obtienen un mayor rendimiento de las cosechas, se amplía el terreno cultivable, se reducen los gastos económicos, se reducen o elimina la dependencia de pesticidas e insecticidas altamente contaminantes para el medio ambiente apoyando un esquema más sostenible de agricultura (ODS 13). Las mejoras brindadas por la mejora genética favorecen la mayor disponibilidad de alimento con meta en el ODS 2 y la mejora de la calidad de los alimentos favorece enormemente la salud y el bienestar (ODS 3).

Listado de abreviaturas

- **5-MT:** 5-metoxitriptamina
- **AAT:** Tratamiento de envejecimiento acelerado
- **ABA:** Ácido abcísico
- **ASDAC:** N-acetilserotonina desacetilasa
- **ASMT:** N-acetilserotonina O-metiltransferasa
- **CaMV:** Virus del mosaico de la coliflor
- **CAT:** Catalasa
- **cDNA:** DNA complementario
- **CEVd:** Viroid del Exocortis de los Cítricos
- **CFU:** Unidades Formadoras de Colonias
- **COMT:** O-metiltransferasa
- **CS:** Cumarolilserotonina
- **ET:** Etileno
- **FS:** Feruloilserotonina
- **FT:** Feruloiltiramina
- **GA:** Ácido gentísico
- **HCAAs:** Amidas de Ácido Hidroxicinámico
- **HSF:** Factores de transcripción del estrés térmico
- **HSP:** Proteína de choque térmico
- **JA:** Ácido jasmónico
- **LIYV:** Virus de los amarillamientos infecciosos de la lechuga
- **MM:** Money Maker
- **Mock:** Tratamiento de control (sin patógeno o compuesto aplicado)
- **NT:** No tratado
- **NUT:** gen NUTCRACKER
- **POD:** Peroxidasa
- **PPO:** Polifenol Oxidasa
- **PR1:** Proteína Relacionada con la Patogénesis 1
- **Pst:** Pseudomonas syringae pv. Tomato
- **RG:** Rio Grande

- **RNAi**: Interferencia por ARN
- **ROS**: Especies reactivas de Oxígeno
- **RT-qPCR**: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa Cuantitativa
- **S5H**: Salicilato 5- Hidroxilasa
- **SA**: Ácido Salicílico
- **SAR**: Respuesta sistémica adquirida
- **SLCV**: Virus del rizado de la hoja de la calabaza
- **SNAT**: Serotonina N-Acetiltransferasa
- **T5H**: Triptamina 5-hidroxilasa
- **TDC**: Descarboxilasa de Triptófano
- **THT**: Transferasa de Hidroxicinamoil Triptamina
- **TSWV**: virus del bronceado del tomate
- **tt10**: *transparent testa 10*
- **tt7**: *transparent testa 7*
- **TYCLV**: Virus del rizado de la hoja amarilla del tomate
- **UGT**: Uridina difosfato glicosiltransferasas
- **WCMoV**: Virus del rizado de la hoja de la calabaza
- **WT**: Tipo Silvestre
- **ΔPst**: Cepa mutante de *Pseudomonas syringae*

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Importancia agronómica del tomate.....	1
1.2. Respuesta defensiva de las plantas	1
1.2.1. Respuesta defensiva frente a estreses bióticos	1
1.2.2. Respuesta defensiva frente a estreses abióticos	3
1.3. Compuestos químicos relacionados con la respuesta defensiva a estreses biótico	4
1.3.1. Amidas de ácido hidroxycinámico.....	4
1.3.2. Flavonoides	6
1.4. Compuestos químicos relacionados con la respuesta defensiva a estrés abiótico	6
1.5. Impacto del estrés sobre el desarrollo radicular, la viabilidad y longevidad de las semillas	8
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y METODOS	9
3.1. Material vegetal	9
3.2. Esterilización de semillas y condiciones de cultivo.....	10
3.3. Estrés abiótico por altas temperaturas o choque térmico	10
3.4. Material microbiológico, infección y conteo bacteriano	11
3.4.1. Preparación del inóculo bacteriano	11
3.4.2. Infección bacteriana	12
3.4.3. Conteo bacteriano.....	12
3.5. Tratamientos con serotonina y melatonina	13
3.6. Tratamiento de aceleración del envejecimiento.....	13
3.7. Estudio de expresión genética por RT-q PCR.....	13
3.7.1. Extracción de RNA	13
3.7.2. Retrotranscripción	14
3.7.3. Amplificación cuantitativa de cDNA a tiempo real (RT-qPCR)	14
3.8. Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	14
3.9. Tinción con tetrazolio y visualización de la permeabilidad de la semilla.....	15
3.10. Análisis estadístico	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1. Caracterización fenotípica de las raíces de las plantas transgénicas <i>35S:THT</i> y <i>RNAi_TWI</i>	16
4.2. Estudio de longevidad de las semillas de las plantas transgénicas <i>35S:THT</i> y <i>RNAi_TWI</i>	19
4.3. Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la ruta de biosíntesis de serotonina y melatonina en plantas de tomate sometidas a diferentes tipos de estrés.....	23

4.4.	Estudio de la activación de la respuesta defensiva tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina en plantas de tomate.....	28
4.4.1.	Análisis de los niveles de expresión de genes defensivos tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina en plantas de tomate	29
4.4.2.	Análisis de los niveles de acumulación de los ácidos salicílico y gentísico tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina en plantas de tomate	32
4.5.	Estudio de la resistencia de plantas de tomate tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina	33
4.6.	Perspectivas futuras	34
5.	CONCLUSIONES	35
6.	BIBLIOGRAFIA.....	36

Índice de Tablas

Tabla 1.	Composición medio de cultivo LB agar.....	11
Tabla 2 .	Composición medio de cultivo King B líquido.....	11
Tabla 3.	Medio de cultivo King B agar	12

Índice de Figuras

Figura 1.	Ruta Biosintética de Flavonoides y Ácidos Hidroxicinámicos.....	5
Figura 2.	Ruta biosintética de la serotonina y melatonina en plantas.	8
Figura 3.	A) Longitud de la raíz principal in vitro B) Número de raíces laterales in vitro C) longitud de la raíz principal en las plantas transgénicas <i>35S:THT</i> , <i>RNAi_TWI 28.3</i> , <i>RNAi_TWI 1.1</i> y sus respectivos fondos genéticos WT (parental <i>THT</i>) y WT (parental <i>TWI</i>), a diferentes tiempos tras su siembra en cultivo in vitro.....	17
Figura 4.	Tinción de tetrazolio cualitativa.....	20
Figura 5.	Tinción de tetrazolio cuantitativa.....	21
Figura 6.	Tasa de semillas germinadas bajo diferentes tratamientos de AAT y un control.	22
Figura 7.	Análisis por RT-qPCR de la expresión del gen <i>TDC2</i> en A) en plantas Money Maker sometidas a un tratamiento de calor de 45°C durante 2h y no sometidas (Control). B) plantas Money Maker heridas y no heridas. C) plantas de tomate Rio Grande inoculadas con la cepa bacteriana avirulenta (Pst), virulenta Pst (Δ Pst) y sin el patógeno (Mock) D) plantas Money Maker infectadas por viroide y no infectadas (Mock).....	25
Figura 8.	Análisis por RT-qPCR, en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o Melatonina 100 mM (Melatonina) , de la expresión del gen A) <i>TDC2</i> B) <i>SNAT</i> ,.....	28
Figura 9.	Análisis por RT-qPCR en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina), de la expresión del gen <i>THT</i> ..	29

Figura 10. Análisis por RT-qPCR en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o Melatonina 100 mM (Melatonina), de la expresión del gen A) *CAT* y B) *POD*. 30

Figura 11. Análisis por RT-qPCR, en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina), de la expresión del gen C) *PR1* D) *S5H*. 31

Figura 12. Cuantificación de (A) ácido salicílico (SA) y (B) ácido gentísico (GA) en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina) 32

Figura 13 Crecimiento de Pst en hojas de plantas Money Maker sin tratamiento, (NT) tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina) el día previo a la infección bacteriana..... 33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia agronómica del tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum*, pertenece a la familia de las Solanáceas, un grupo diverso que comprende alrededor de 1500 especies distribuidas en diferentes regiones del mundo. Esta planta herbácea es ampliamente reconocida por su significativa importancia económica como cultivo hortícola. En el año 2022, la producción global anual de tomates alcanzó aproximadamente los 186.1 millones de toneladas (FAOSTAT, 2022), siendo uno de los cultivos más relevantes en términos de volumen de producción y valor comercial.

Desde su domesticación inicial, el tomate ha experimentado una notable diversificación genética, dando lugar a una amplia variedad de formas, tamaños, colores y sabores. Esta variabilidad genética ha sido ampliamente aprovechada en programas de mejora vegetal para desarrollar variedades adaptadas a diferentes climas, suelos y preferencias de consumo, lo que ha contribuido significativamente a su expansión global como uno de los cultivos más populares y versátiles.

Los tomates contienen una variedad de compuestos nutricionales beneficiosos, tales como el ácido ascórbico (vitamina C) tocoferoles (vitamina E), y compuestos fenólicos bioactivos como ácido cafeico, ferúlico, clorogénico o los flavonoides quercetina, kaempferol, naringenina, así como β -carotenoides entre los que cabe destacar el licopeno (Roşca et al., 2023).

1.2. Respuesta defensiva de las plantas

Debido a su naturaleza sésil, las plantas han desarrollado mecanismos para adaptarse a condiciones adversas, como los estreses bióticos y abióticos. En su entorno, hay una gran variedad de microorganismos, incluidos hongos, bacterias, virus y viroides, que pueden ser patógenos. No obstante, solo una pequeña parte de estos microorganismos logra causar enfermedades en las plantas, lo que demuestra que las plantas han desarrollado defensas que les permiten resistir a estas enfermedades. El sistema inmune de las plantas está compuesto por una compleja red de barreras defensivas, tanto innatas como inducibles. Sin embargo, la producción de tomate no está exenta de desafíos. La presencia de estreses bióticos, como plagas y enfermedades, y estreses abióticos, como cambios climáticos extremos y condiciones del suelo desfavorables plantean grandes retos.

1.2.1. Respuesta defensiva frente a estreses bióticos

Entre las principales amenazas biológicas para los cultivos de tomate se encuentran un gran número de insectos, entre los que destaca la mosca blanca *Bemisia tabaci* que en una alta densidad de población puede retrasar el crecimiento e incluso matar plantas jóvenes mediante la alimentación directa (Khan & Wan, 2015). Este insecto, que se alimenta de savia, es portador de más de 200 especies de virus vegetales, entre los cuales se encuentran el virus del rizado de la hoja amarilla del tomate (TYLCV), el virus de los

amarillamientos infecciosos de la lechuga (LIYV), y la cepa de moteado rizado del melón perteneciente a la familia de los virus del rizado de la hoja de la calabaza (WCMoV/SLCV) (Jafarbeigi et al., 2020). Los trips del género *Frankliniella*, los ácaros del género *Tetranychus* y los pulgones como *Macrosiphum euphorbiae* también son plagas considerables. Por otro lado, están los masticadores como *Tuta absoluta* que puede causar considerables daños a los cultivos de tomate debido a que las larvas recién eclosionadas penetran en los tejidos vegetales de los cuales se alimentan empeorando el rendimiento y la calidad de la fruta debido no solo al daño directo causado por los insectos sino también a la entrada de patógenos secundarios, los cuales pueden ingresar a los tejidos de la planta a través de las heridas de alimentación, llegando a provocar una disminución de hasta el 60% en los rendimientos (D'Esposito et al., 2021). Además, las plantas de tomate pueden verse afectadas por infecciones de nemátodos endoparásitos, como *Meloidogyne* sp., que forman nódulos en las raíces generando daños al tomate con pérdidas de rendimiento estimadas de hasta el 40% en regiones de clima cálido.

El principal modelo para estudiar la respuesta por estrés biótico es la interacción entre las plantas y la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*) ya que representa un paradigma bien establecido en la investigación de la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos. Esta bacteria, catalogada como gram-negativa, aerobia estricta, con flagelos polares y forma bacilar, ha sido extensamente estudiada debido a su capacidad de infectar una amplia gama de especies vegetales (Hirano & Upper, 2000). Así pues, puede infectar tanto tomate como *Arabidopsis thaliana*, una especie vegetal usada como modelo, lo que la convierte en un valioso modelo de estudio para comprender los mecanismos moleculares de la interacción planta-bacteria y que presenta importantes repercusiones económicas en los cultivos agronómicos.

La infección por *Pst* implica dos fases distintas: una fase epífita, donde la bacteria crece en la superficie de la planta, y una fase necrótica, donde penetra en los tejidos a través de estomas o heridas, causando daños necróticos rodeados de un halo clorótico en las hojas (Katagiri et al., 2002).

La percepción de *Pst* por la planta desencadena una serie de respuestas defensivas, incluida la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR) mediada por el ácido salicílico (SA) (Ryals et al., 1996). Sin embargo, la hormona vegetal ácido jasmónico (JA) puede promover la infección bacteriana al antagonizar la acción del SA. Además, *Pst* ha desarrollado estrategias para evadir la respuesta inmune de la planta, como la producción de la toxina coronatina, un análogo funcional de JA que induce la reapertura estomática para facilitar la entrada bacteriana (Melotto et al., 2017). El ciclo de infección de *Pst* comienza con su entrada a través de los estomas, aunque las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para limitar este acceso, como el cierre estomático mediado por la percepción de la bacteria (War et al., 2012). Posteriormente, la bacteria coloniza los espacios apoplásticos dentro de los tejidos vegetales, donde puede interferir con la respuesta defensiva de la planta mediante la producción de fitotoxinas y la degradación de compuestos antimicrobianos (Sanzón Gómez & Mejía, 2011).

1.2.2. Repuesta defensiva frente a estreses abióticos

El estrés abiótico también es un factor determinante en el desarrollo de la planta y su impacto puede ser muy significativo en los cultivos de tomate. La variabilidad climática y los cambios ambientales impredecibles están exacerbando estos estreses, lo que hace que la producción de tomate sea aún más vulnerable a factores externos. La sequía es de los más representativos, provocando múltiples respuestas en las plantas, como la detención del crecimiento de los brotes, la inhibición del inicio de nuevas hojas y la promoción de la senescencia en las hojas más antiguas, lo que resulta en una disminución significativa del tamaño de la copa y el rendimiento de los cultivos (Thirumalaikumar et al., 2018).

Muchas zonas geográficas recientemente se están enfrentando a problemas de salinización del suelo derivados principalmente de métodos de riego inadecuados, así como otras prácticas de cultivo inadecuadas lo cual repercute negativamente sobre las plantas. La salinidad influye en las plantas afectando a la absorción de agua al reducir el potencial osmótico, lo que dificulta que las raíces tomen agua del suelo. También pueden generar efectos tóxicos en las plantas, como Na^+ que compite con otros cationes o Ca^{2+} que puede interferir con los sitios de unión en la pared celular de la raíz, perturbando procesos fisiológicos esenciales, como el crecimiento primario, mediante la alteración del entrecruzamiento de la pectina (Hoffmann et al., 2020).

Por último, las temperaturas extremas son un factor que ha adquirido gran relevancia derivado de la tendencia de aumento de la temperatura media global unido a las condiciones atmosféricas más extremas y cambiantes que exponen picos más abruptos de temperatura asociado al avance del cambio climático. Las temperaturas adecuadas para el crecimiento normal del tomate oscilan entre los 13 y los 33 ° C. Todas las temperaturas superiores provocan un estrés en la planta que va en deterioro de su desarrollo y productividad. Como respuesta, las enzimas antioxidantes, el calcio, y las vías de señalización de las auxinas y del ácido abscísico (ABA) son elementos que contribuyen a la resistencia al estrés por calor en las plantas. No obstante, son los factores de transcripción del estrés térmico (*HSE*, del inglés heat shock factors) y las proteínas de choque térmico (*HSP*, del inglés heat shock proteins) los que han sido identificados como genes clave para desempeñar un papel fundamental en la capacidad de las plantas para resistir el calor (Zhang et al., 2018). De igual manera temperaturas inferiores también suponen un desafío para la planta, siendo una limitación ambiental que determina la productividad y la calidad del fruto, así como determina la distribución geográfica de este cultivo.

1.3. Compuestos químicos relacionados con la respuesta defensiva a estreses biótico

Los compuestos químicos relacionados con la defensa ante estreses bióticos son una variedad de metabolitos secundarios, como fenólicos, alcaloides y terpenoides, que las plantas producen en respuesta a ataques de patógenos y herbívoros (Mascellani et al., 2024). Estos compuestos desempeñan roles cruciales en la señalización y en la inhibición directa del crecimiento de agentes infecciosos, formando parte integral de los mecanismos de defensa inducidos en condiciones de estrés biótico.

Los flavonoides y las amidas de ácido hidroxicinámico (HCAAs) son compuestos fenólicos clave en la defensa biótica de las plantas. Los flavonoides, con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, participan en la neutralización de especies reactivas de oxígeno y en la inhibición del crecimiento de patógenos (Ramaroson et al., 2022). Por su parte, las HCAAs actúan como barreras químicas, interfiriendo en la actividad enzimática de los patógenos e insectos herbívoros, y contribuyendo a la fortificación de las paredes celulares en respuesta al ataque (Campos et al., 2014).

1.3.1. Amidas de ácido hidroxicinámico

Las amidas de ácido hidroxicinámico (HCAAs) son un conjunto de metabolitos pertenecientes al grupo de los fenilpropanoides. Están formadas por la conjugación de una amina con un ácido hidroxicinámico (Figura 1). Las aminas pueden ser lineales, tales como la putrescina, cadaverina, espermidina y espermina; o aromáticas tales como la tiramina, octopamina, noradrenalina y triptamina. Los ácidos hidroxicinámicos, por su parte, incluyen el ácido ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y sinápico. Las HCAAs desarrollan una gran variedad de funciones en la planta al fortalecer las paredes celulares o como antimicrobianos (Zeiss et al., 2021) y juegan un papel crucial en la respuesta frente a enfermedades (Liu et al., 2022). Las HCAAs tienden a acumularse en plantas infectadas induciendo la respuesta hipersensible (Walters, 2003), actúan como reguladores de la expresión de genes de síntesis de compuestos protectores y regulan la deposición de lignina (Lima et al., 2013) y callosa (Macoy et al., 2022), para fortalecer la estructura y resistencia contra las enzimas hidrolíticas de los hongos. Además, interactúan con hormonas vegetales como el ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido jasmónico (JA) para modular la respuesta inmune de las plantas ante patógenos (Li et al., 2021). Además de la defensa, se están estudiando funciones relacionadas con el desarrollo de la formación floral, encontrando HCAAs diferenciales entre órganos masculinos y femeninos (Tarenghi & Martin-Tanguy, 1995). También se relacionan con el proceso de formación de tubérculos en otras Solanáceas y regulan los niveles de poliamidas libres que potencialmente actúan como compuestos de almacenamiento durante la germinación de las semillas y la expansión celular (Bonneau et al., 1994).

Las HCAAs tienen una doble función en las células vegetales, inducen la producción de ROS como mecanismo defensivo contra patógenos y actúan como antioxidantes para proteger las células del daño (Xiang et al., 2019). El ácido ferúlico puede desencadenar el estallido oxidativo en las raíces de las plantas, activando genes vinculados a la

formación de la pared celular y la desintoxicación química (Chi et al., 2013). En nuestro laboratorio se identificó la acumulación de varias HCAAs en plantas de tomate como respuesta a la infección por *Pst* (Zacarés et al., 2007, López-Gresa et al., 2011) e incluso se patentó el compuesto *trans*-feruloil-noradrenalina por su potente actividad antioxidante (López-Gresa et al., 2011). Para profundizar en la función de las amidas derivadas del ácido N-hidroxicinámico, en nuestro laboratorio se generaron plantas transgénicas de tomate de la variedad Money Maker que sobreexpresan el gen *THT* empleando el promotor constitutivo 35S de Virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Este gen cataliza la formación de las amidas en plantas superiores, como el tomate y juega un papel crucial en la respuesta defensiva de la planta frente al daño mecánico y a las infecciones patogénicas. La infección bacteriana en plantas de tomate induce la expresión de *THT* y la acumulación de HCAAs, por lo que la sobreexpresión del gen *THT* conduce a una mayor resistencia a la bacteria *Pst*, acompañada de una mayor síntesis de ácido salicílico y la inducción de genes de resistencia (Campos et al., 2014). La mayor acumulación de HCAAs analizada en estas plantas transgénicas podría explicar este fenotipo de resistencia al fortalecer la pared celular y actuar como agente antimicrobiano, lo que subraya su importancia en la defensa de la planta (Hagel & Facchini, 2005).

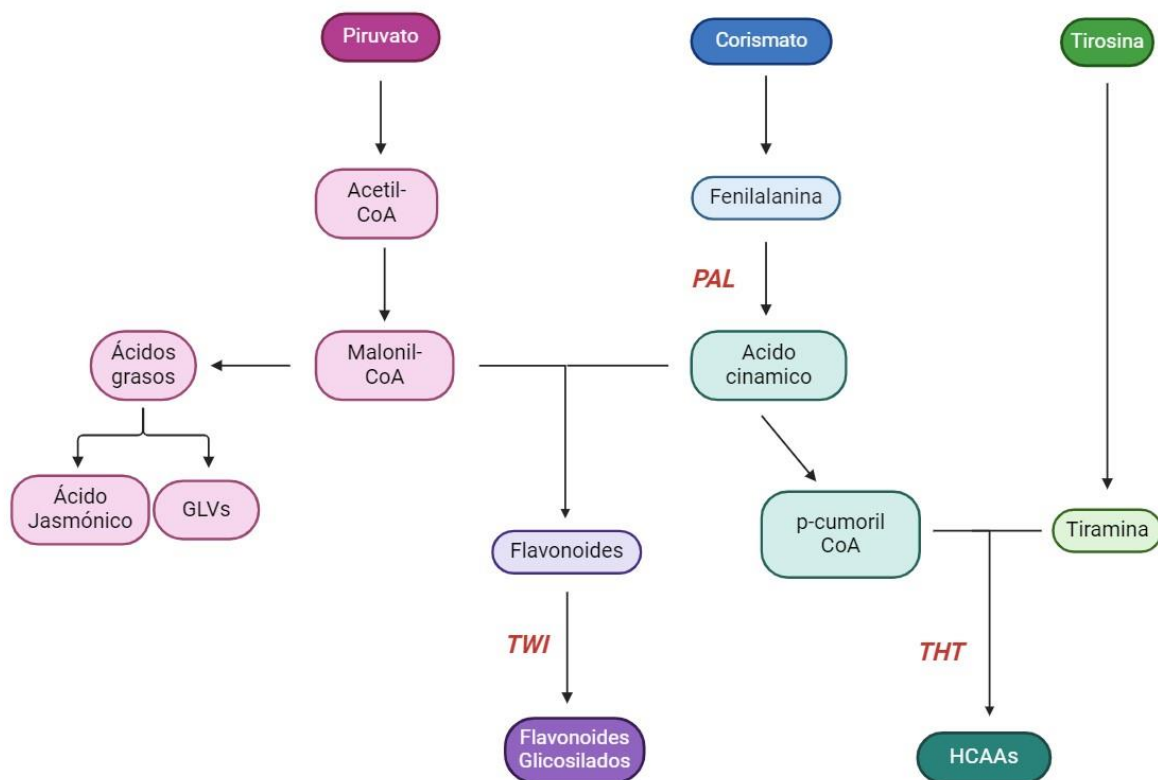


Figura 1. Ruta Biosintética de Flavonoides y Ácidos Hidroxicinámicos. La enzima *THT* (*Hidroxicinamoil-transferasa*) cataliza la síntesis de HCAAs (amidas derivadas del ácido hidroxicinámico) a partir de la tiramina y el *p*-cumaroil-CoA. Mientras los flavonoides producidos a partir de Malonil-CoA y el ácido cinámico son glicosilados por *TWI*. Elaboración propia utilizando Biorender.

1.3.2. Flavonoides

Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA dando lugar a un producto que posteriormente se cicla para dar lugar a una estructura base C6-C3-C6 (Figura 1). Dicha estructura puede sufrir numerosas modificaciones, dando lugar a una familia muy diversa de compuestos que desarrollan una amplia variedad de funciones en las plantas. Entre ellas, cabe destacar el mantenimiento de la integridad estructural, proporcionando resistencia y protección mecánica y la protección frente a la radiación UV, (Van De Staaij et al., 2002). También actúan como reguladores de funciones fisiológicas como la apertura estomática (Lewis et al., 2011), en la asignación de recursos en condiciones de crecimiento deficientes (Kuhn et al., 2011), o como señalizadores celulares y participando en la regulación del transporte polar de auxinas. Contribuyen al color y fertilidad del polen (Mo et al., 1992) y en la producción de semillas. También actúan como mediadores en interacciones como la nodulación de leguminosas regulando la respuesta de las raíces a los rizobios para establecer simbiosis (Wasson et al., 2006) y en la comunicación de las plantas con insectos y microbios, actuando como atrayentes o repelentes (Mandal et al., 2010). Además, protegen frente al estrés actuando como antioxidantes eliminadores de radicales libres y quelando metales (Williams et al., 2004) y responden al estrés biótico actuando como fitoalexinas, contribuyendo a la resistencia contra patógenos y herbívoros (Mandal et al., 2010).

En nuestro laboratorio se ha recurrido a la manipulación génica de *Twil* en plantas de tomate para demostrar la influencia de este gen y sus productos sobre la susceptibilidad a infecciones virales. Las plantas transgénicas que silencian el gen *Twil* presentan niveles alterados de flavonoides debido a la represión de este gen implicado en la glicosilación de los flavonoides quercetina y kaempferol. La glicosilación, catalizada por enzimas denominadas uridina difosfato glicosiltransferasas (UGT), es un proceso clave en la modificación de metabolitos secundarios en plantas, como los compuestos fenólicos (Paquette et al., 2003). Este proceso reduce la toxicidad, aumenta la solubilidad y la acumulación de los metabolitos, y regula su localización subcelular y sus actividades biológicas. Las UGTs, están implicadas en la activación de respuestas a diversos tipos de estrés (Qi et al., 2005) y la síntesis de la pared celular (Egelund et al., 2004). En el tomate, la glicosiltransferasa *Twil* se induce en respuesta a herida, aplicación de SA y tratamientos con agentes activadores fúngicos y su silenciamiento produce un aumento de susceptibilidad al virus del bronceado del tomate (TSWV), asociándose de esta manera a respuestas defensivas (Campos et al., 2019).

1.4. Compuestos químicos relacionados con la respuesta defensiva a estrés abiótico

La serotonina participa en la regulación de la tolerancia al estrés abiótico en plantas a través de la modulación de los niveles de triptófano (Kaur et al., 2015). La biosíntesis de serotonina comienza a partir del triptófano y está influenciada por factores de estrés que aumentan sus niveles (Liu et al., 2022). Este proceso es catalizado por las enzimas triptófano descarboxilasa (*TDC*) y triptamina 5-hidroxilasa (*T5H*), que producen triptamina y serotonina, respectivamente (Figura 2). Estas moléculas comparten el

triptófano como precursor con las auxinas, fitohormonas implicadas en el crecimiento de las plantas, generando una competición por el mismo. (Tsunoda et al., 2021).

El estrés abiótico, como el causado por la salinidad y la sequía, induce la acumulación de serotonina, lo que puede influir en la inhibición del crecimiento inducido por el estrés, a través de la modulación de la síntesis de auxinas (Mukherjee et al., 2014). Pero sin duda su mayor relevancia se percibe como precursor de la melatonina. En las plantas, la biosíntesis de melatonina puede seguir dos rutas principales (Figura 2). La primera es la vía de la N-acetilserotonina, donde el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano y luego en serotonina. La serotonina es acetilada por la enzima serotonina N-acetiltransferasa (*SNAT*) para formar N-acetilserotonina, que finalmente se convierte en melatonina mediante la enzima N-acetilserotonina O-metiltransferasa (*ASMT*). La segunda ruta es la vía de la 5-metoxitriptamina (*5-MT*), en la cual el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano y luego en serotonina, que se transforma *5-MT* mediante el enzima ácido cafeico O-metiltransferasa (*COMT*). Finalmente, la *5-MT* es acetilada por la enzima *SNAT* para producir melatonina (Negri et al., 2021).

La melatonina, una biomolécula natural de peso molecular reducido y amplia distribución, desempeña un papel fundamental como regulador clave en el reino vegetal, especialmente en respuesta a diversos factores de estrés abiótico como la salinidad, sequía, variaciones térmicas, pH alterado, contaminación atmosférica y exposición a metales pesados (Hardeland, 2016). En plantas de la familia de las Solanaceas, como el tomate, esta sensibilidad al estrés abiótico impacta significativamente en su crecimiento y desarrollo, afectando en última instancia su producción y rendimiento. La melatonina, actuando como un potente antioxidante, bioestimulador y regulador del crecimiento, desempeña un papel crucial al mejorar la fotosíntesis, retardar la senescencia foliar y fortalecer el sistema antioxidante mediante la eliminación directa de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante situaciones de estrés abiótico (Sharif et al., 2018). La melatonina actúa como un potente antioxidante debido a su estructura química, que incluye una fracción indol rica en electrones y dos grupos de cadena lateral (5-metoxi y 3-amida), proporcionando alta estabilidad de resonancia y baja energía de activación para la eliminación de radicales libres. Sus cadenas laterales, especialmente el grupo carbonilo de la cadena amida C3, son cruciales en la extinción de especies reactivas de oxígeno (ROS), permitiendo a la melatonina neutralizar hasta cuatro ROS diferentes, pero además reforzando esta función activando rutas de señalización de defensa frente a oxidación. Se ha observado que la aplicación exógena de melatonina mejora la resistencia al estrés por frío en plántulas de fresa aliviando la restricción del crecimiento causada por el estrés por frío, mostrando un menor grado de marchitamiento y una reducción de la clorosis en las hojas (Hayat et al., 2022). Además, se ha observado que la melatonina potencia características morfológicas vitales, como el crecimiento vegetativo, la fotosíntesis foliar y el desarrollo del sistema radicular, así como mejora la absorción de nutrientes y la resistencia a una variedad de estresores abióticos (Sharif et al., 2018).

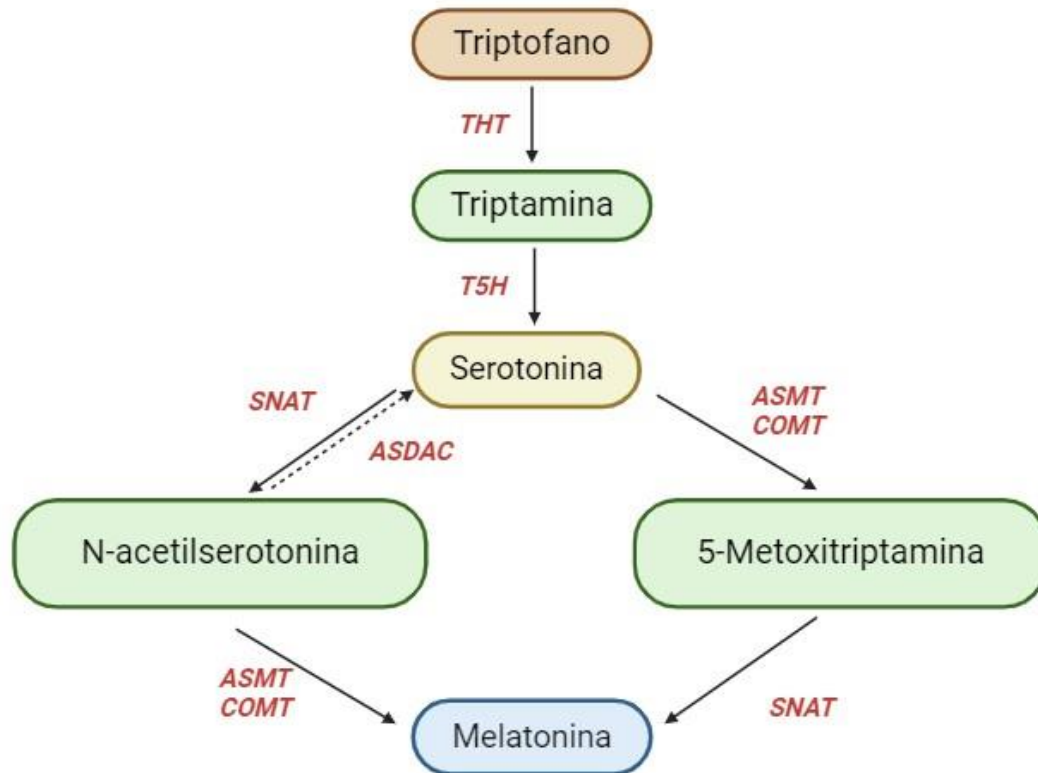


Figura 2. Ruta biosintética de la serotonina y melatonina en plantas. Las enzimas que participan en este metabolismo son la triptófano descarboxilasa (TDC), triptamina 5-hidroxilasa (T5H), serotonina N-acetiltransferasa (SNAT), N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT), ácido cafeico O-metiltransferasa (COMT) y N-acetilserotonina desacetilasa (ASDAC).

1.5. Impacto del estrés sobre el desarrollo radicular, la viabilidad y longevidad de las semillas

El estrés ambiental tiene un impacto significativo en el desarrollo radicular, la viabilidad y la longevidad de las semillas, aspectos críticos para el éxito del cultivo de tomate. Factores como la sequía, salinidad y temperaturas extremas pueden alterar la arquitectura radicular, reduciendo la capacidad de las raíces para absorber agua y nutrientes esenciales (Yamaguchi & Sharp, 2010). Además, el estrés durante la fase de germinación puede disminuir la viabilidad de las semillas y afectar su longevidad, lo que compromete la estabilidad de los cultivos en el largo plazo (Rajjou et al., 2012). En particular, el estrés oxidativo generado por condiciones adversas puede dañar las membranas celulares y el ADN, lo que resulta en una menor tasa de germinación y un desarrollo radicular subóptimo (Bailly, 2004). Estos factores subrayan la importancia de entender y mitigar los efectos del estrés en el ciclo de vida de las semillas de tomate para mejorar la productividad agrícola.

2. OBJETIVOS

1. Identificar nuevas funciones de las HCAAs y de los flavonoides en planta. En particular, se pretende:

- 1.1. Estudiar el papel de las HCAAs y de los flavonoides en el desarrollo, crecimiento y estructura de la raíz del tomate, tanto en condiciones de cultivo *in vitro* como *in vivo*.
- 1.2. Estudiar el papel de las HCAAs y de los flavonoides en la longevidad de las semillas analizando su viabilidad y deterioro tras un tratamiento de envejecimiento acelerado.

2. Analizar el papel de la serotonina y melatonina en la respuesta defensiva de las plantas de tomate. Para desarrollar este objetivo general, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- 2.1 Cuantificar la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de serotonina y melatonina en diferentes condiciones de estrés.
- 2.2. Estudiar del fenotipo de resistencia a una infección bacteriana tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Material vegetal

Para los diferentes análisis posteriormente propuestos se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de las variedades Rio Grande (RG) y MoneyMaker (MM), así como plantas modificadas genéticamente en fondo MM que presentan niveles alterados de amidas derivadas el ácido hidroxicinámico (*35S:THT*) y flavonoides (*RNAi_twil*). Específicamente, se trabajó con las plantas transgénicas homocigotas de la línea *35S:THT* que sobreexpresa el gen *THT* que codifica la tiramina N-hidroxicinamoil transferasa, la cual participa en la síntesis de amidas del ácido hidroxicinámico (Campos et al., 2014) y de dos líneas transgénicas homocigotas *RNAi_twil* (*Twil* 1.1 y *Twil* 28.3), las cuales tienen silenciada la expresión del gen *Twil*, que codifica para una glicosiltransferasa, que pertenece a la familia de las UGTs (glicosiltransferasas de productos secundarios de plantas). Esta enzima es responsable de transferir un grupo glucosa a los flavonoides quercetina y kaemferol, implicados en la defensa de la planta contra patógenos (Campos et al. 2019).

3.2. Esterilización de semillas y condiciones de cultivo

Las semillas de tomate se germinaron bajo condiciones estériles mediante el empleo de cultivo *in vitro* en cabinas de flujo laminar. Para este propósito, se envolvieron las semillas en tela de muselina o Microcloth, y se procedió a introducirlas en un envase con una solución compuesta por una dilución 1:1 de lejía comercial y agua destilada, con la inclusión de un 0,05% (v/v) de Tween-20 con el fin de disminuir la tensión superficial del fluido. Tras un periodo de 30 minutos de inmersión con una agitación leve, las semillas fueron sometidas a lavados secuenciales de 5, 10 y 15 minutos en recipientes que contenían agua destilada esterilizada, lo que permite la eliminación de posibles residuos de lejía y estimula la germinación de las semillas. Aquellas destinadas para evaluar la capacidad de germinación de las semillas de tomate tras tratamientos de envejecimiento se observó su germinación durante los 15 días posteriores a ser destapadas y después fueron desechadas.

Todas las plántulas utilizadas fueron sembradas en placas cuadradas de 23,5 cm x 23,5 cm con medio MS con azúcar y mantenidas en condiciones de oscuridad durante tres días a una temperatura de 24 °C, seguidos de tres días adicionales bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las plantas destinadas a comparaciones fisiológicas *in vitro* se sembraron en placas cuadradas de tamaño 24,5 x 24,5 x 2,5 cm. Se tomaron medidas de longitud de raíz, número de raíces laterales y longitud de raíces laterales a los 7,10,15 y 22 días.

Posteriormente, las mismas plántulas destinadas a comparaciones fisiológicas fueron trasladadas a macetas que contenían una mezcla de turba y vermiculita en una proporción de 1:1, siendo ubicadas en un invernadero con control de temperatura (18-24 °C), humedad relativa (50-70%) y un fotoperiodo de día largo 16 horas de luz y 8 de oscuridad. A lo largo de todo el proceso, se administró riego a las plantas mediante la aplicación de la solución nutritiva de Hoagland, asegurando así su adecuado crecimiento y desarrollo. Para su caracterización fisiológica *in vivo*, fueron extraídas del cultivo *in vitro* y se trasladaron a macetas de 12 cm de diámetro rellenas únicamente con vermiculita para favorecer la posterior exposición de las raíces. Pasados 48 días se eliminó la vermiculita cuidadosamente para medir la longitud de la raíz principal de las plantas.

3.3. Estrés abiótico por altas temperaturas o choque térmico

El estrés por altas temperaturas plantas adultas se consiguió sometiendo a las plantas inicialmente a temperaturas de 37°C durante hora y media, seguido de un periodo de recuperación a 24°C durante hora y media para finalmente aplicar una temperatura de 45°C durante dos horas (Wanget al., 2021). Tras este periodo de choque térmico se procedió a la toma de muestras que se recogieron en frascos y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido, siendo posteriormente almacenados en cámaras a -80°C hasta su análisis. El material vegetal se homogeneizó en condiciones de frío con un molino mezclador MM400 Retsch™.

3.4. Material microbiológico, infección y conteo bacteriano

En el presente estudio se empleó la cepa bacteriana avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst*) y la cepa virulenta *Pst* con deleciones en los genes *avrPto* y *avrPtoB* (ΔPst) conservadas en glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.1. Preparación del inóculo bacteriano

La bacteria se cultivó en oscuridad durante 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en placas de Petri de 90 mm de diámetro con 25 mL de medio LB agar, suplementado con los antibióticos rifampicina (10 mg/mL) y kanamicina (100 mg/mL). Posteriormente, se seleccionó una colonia y se inoculó en tubos Falcon de 50 mL que contenían 3 mL de medio líquido King B con rifampicina (10 mg/mL). Estos tubos se incubaron en una cámara de crecimiento bacteriano a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación (200 rpm) durante 24 horas. Luego, se transfirió 1 mL del cultivo bacteriano a 12 tubos Falcon separados, cada uno con 14 mL de medio líquido King B, y se continuó el cultivo bajo las mismas condiciones de agitación, temperatura y oscuridad durante otras 24 horas.

COMPUESTO	CANTIDAD (1L)
Agua destilada	1 L
LB agar	35 g
Rifampicina	10 mL
Kanamicina	0.5 mL

Tabla 1. Composición medio de cultivo LB agar

COMPUESTO	CANTIDAD (1L)
Agua destilada	1 L
Glicerol	15 g
K_2HPO_4	1,5 g
MgSO_4	5 mL
Proteosa peptona	10 g
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

Tabla 2 . Composición medio de cultivo King B líquido.

Una vez alcanzado el crecimiento deseado, el cultivo bacteriano se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 20 mL de solución estéril de cloruro de magnesio (MgCl_2) 10 mM. Para ajustar la concentración bacteriana, se midió la absorbancia del cultivo (dilución 1:10) a 600 nm, y se calculó el volumen necesario para obtener una densidad óptica (D.O.) de 0,1, lo que corresponde a una concentración de 5×10^7 unidades formadoras de colonias (CFU)/mL.

3.4.2. Infección bacteriana

El método de infección utilizado fue el de inmersión. Este procedimiento consistió en sumergir las plantas de 25-30 días hasta la base del tallo en una solución bacteriana de MgCl₂ 10 mM con Silwet al 0,05%, ajustada a una densidad óptica (D.O.) de 0,1, durante 30 segundos. Como control (mock), las plantas fueron sumergidas en una solución similar, pero sin la adición de bacterias.

3.4.3. Conteo bacteriano

El conteo bacteriano se realizó midiendo las unidades formadoras de colonias (CFU) en el material vegetal infectado. 24 horas después de la infección, se extrajeron 3 discos de 0,95 cm² de foliolos infectados de cada planta utilizando un sacabocados, y se colocaron en tubos Eppendorf con 300 µL de MgCl₂ 10 mM estéril. A cada tubo se añadieron 10 bolas de vidrio y se trituraron en el homogeneizador TissueLyser II (Qiagen). El tejido triturado se diluyó con 700 µL de MgCl₂ hasta alcanzar un volumen total de 1 mL y se homogenizó adicionalmente con un vórtex en una cabina de flujo laminar.

Para determinar la población bacteriana, se realizaron diluciones seriadas 1:10 del material infectado hasta alcanzar la dilución 10⁻⁶. Se sembraron 4 diluciones (10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻²) por planta en placas Petri de 90 mm de diámetro con 25 mL de medio King B agar suplementado con rifampicina (ver Tabla 3). Se añadieron 100 µL de cada dilución y se extendieron con perlas de vidrio. Después de incubar las placas a 28 °C durante 48 horas, se contó el número de colonias con una lupa conectada a un contador de colonias (Selecta; Vidrafoc). Con el número de colonias se calculó el número de CFU/cm² y el logaritmo en base 10 de dichas CFU según se indica en la ecuación [1].

COMPUESTO	CANTIDAD (IL)
Agua destilada	1 L
Glicerol	15 g
King B agar (King B Medium Pseudomonas F Agar USP) (Pronadisa)	37 g
Rifampicina (10 mg/mL)	5 mL

Tabla 3. Medio de cultivo King B agar

$$\log \frac{cfu}{cm^2} = \frac{\text{número de colonias} \times 10 \times 10^{\text{dilución}}}{3 (\text{número de discos})} \quad [1]$$

3.5. Tratamientos con serotonina y melatonina

Se prepararon soluciones de serotonina y melatonina a una concentración de 100 μM . Para ello, se disolvieron cantidades adecuadas de cada compuesto en agua destilada estéril, obteniendo un volumen final de 100 mL de solución (Luo et al., 2023). Ambas soluciones se almacenaron en frascos de vidrio estériles y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. El tratamiento se aplicó mediante un pulverizador automático, asegurando una distribución uniforme de las soluciones sobre la superficie de 3 plantas de tomate, realizándose además un control negativo en el cual el tratamiento utilizado fue únicamente agua estéril para evaluar el efecto de la pulverización.

3.6. Tratamiento de aceleración del envejecimiento

El tratamiento de aceleración del envejecimiento (AAT, del inglés Accelerating Ageing Treatment) o tratamiento de deterioro artificial se realizó para someter las semillas a condiciones de estrés que fomenten la obtención de unas semillas envejecidas en un periodo de tiempo corto y accesible a la realización de los experimentos.

Para ello se introdujeron 20 semillas en tubos Eppendorf® para los distintos tiempos de tratamiento. y se sometieron a un entorno con humedad relativa 99% y temperatura estable de 20°C durante 3 días. Seguidamente, se sometieron a 60°C (Jaap G , 1996) a los respectivos tiempos de tratamiento (Control, 0min, 30min, 60min y 90min). Por último, se extraen los tubos Eppendorf® para obtener una progresión en el deterioro o envejecimiento de las semillas.

Tras realizar el tratamiento la mitad de las semillas, es decir 10 se destinarán a tinción con tetrazolio y visualización de la permeabilidad de la semilla por lo cual se transfieren del tubo Eppendorf® a uno nuevo donde se realizará este ensayo, mientras que los 10 restantes serán empleadas para realizar el estudio de germinación.

3.7. Estudio de expresión genética por RT-q PCR

3.7.1. Extracción de RNA

Para extraer RNA de hojas de tomate, se utilizó tejido fresco homogeneizado que fue congelado a -80 °C. El proceso de extracción se realizó en condiciones frías usando el kit Nucleospin® RNA Plant (MACHEREY-NAGEL), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del RNA extraído de cada muestra se efectuó con el espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop® ND-1000, calibrado con agua libre de RNasas (incluida en el kit de extracción). La absorbancia se midió a 260 nm. Para asegurar la calidad del RNA, se verificaron las relaciones de absorbancia a distintas longitudes de onda, $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, y todos los RNA analizados mostraron valores entre 1,8 y 2,0.

3.7.2. Retrotranscripción

Se utilizó el kit comercial PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara, siguiendo rigurosamente el procedimiento detallado por el fabricante para llevar a cabo la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir del RNA previamente extraído mediante la enzima retrotranscriptasa. Se procedió a la preparación de una nueva muestra en un tubo Eppendorf®, donde se combinaron 1 µg de mRNA, 2 µL de tampón, 0,5 µL de oligo dT primer 50 µM, 0,5 µL de enzima RT, y se completó el volumen hasta alcanzar 10 µL con agua DEPC. Tras obtener esta mezcla homogénea, las muestras se sometieron a una incubación a 37°C en un termobloque durante un lapso de 15 minutos para facilitar la transcripción reversa. Posteriormente, con el propósito de desactivar la enzima retrotranscriptasa, se procedió a incubar las muestras a 85°C en el termobloque durante unos breves segundos. Como paso final, el cDNA resultante de cada muestra se diluyó a una proporción de 1:10 con agua DEPC y se almacenó a -20°C en un equipo de refrigeración adecuadamente acondicionado.

3.7.3. Amplificación cuantitativa de cDNA a tiempo real (RT-qPCR)

Se utilizó el SYBR® Green PCR Master Mix para la detección en tiempo real del DNA amplificado. Las muestras se prepararon en una placa de 96 pocillos y se agregaron 10 µL de reacción en cada pocillo. Se utilizó el gen endógeno Actina como control interno y se realizaron tres repeticiones técnicas para cada réplica biológica de cDNA. La amplificación se llevó a cabo en un equipo de RT-qPCR, el modelo QuantStudio3.

3.8. Análisis de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la extracción y cuantificación del ácido salicílico (SA), se tomaron 500 mg de tejido foliar fresco, los cuales se homogeneizaron y congelaron en tubos Eppendorf de 2 mL. A cada muestra se le añadieron 1,5 mL de metanol, que contenía ácido orto-anísico (OA) a una concentración de 0,025 mM, utilizado como estándar interno. La mezcla se homogenizó con un vórtex y se sometió a ultrasonido durante 10 minutos para asegurar la completa desintegración del tejido. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se transfirió a un tubo de vidrio de 4 mL. Para maximizar la extracción, el residuo se re-suspendió en 500 µL de metanol con OA 0,025 mM y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. El segundo sobrenadante se combinó con el primero, y el volumen total se dividió en dos partes para la extracción de SA libre y SA total. Finalmente, los viales se secaron con una corriente de nitrógeno (N₂) a 37 °C hasta evaporar completamente el metanol.

Para determinar el contenido total de SA (libre y glucosilado), se añadieron 100 µL de β-glucosidasa (Fluka) a una concentración de 10 mg/mL en acetato de sodio 0,1 M (pH 4,5) y 900 µL de acetato de sodio 0,1 M (pH 4) a los viales, los cuales se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Para cuantificar el SA libre, las muestras se re-suspendieron en 1

mL de acetato de sodio 0,1 M (pH 4,5) y también se incubaron toda la noche a 37 °C. Después de la incubación, se añadieron 77 µL de ácido perclórico al 70 % a todas las muestras para detener la reacción enzimática. Los compuestos fenólicos se extrajeron mediante una extracción líquido-líquido utilizando 2,5 mL de una mezcla ciclopentano:acetato de etilo (1:1). La fase orgánica se secó bajo una corriente de N₂ a 37 °C y, una vez evaporada, se añadieron 300 µL de metanol. Esta mezcla se filtró utilizando una jeringa de 1 mL equipada con un filtro Millipore de nylon de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de poro (Waters).

Para el análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC, se siguió el protocolo descrito por (Prol et al., 2021). Se transfirieron 100 µL del extracto a viales específicos para HPLC (Accuform PP vial 0,7 mL, Thermo Scientific) y se inyectaron 30 µL en una columna de fase reversa (Baker), utilizando un gradiente de metanol del 0 al 100 % en agua durante 20 minutos, con un flujo constante de 1 mL/min. El SA y el OA se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, con una longitud de onda de excitación de 313 nm y una de emisión de 404 nm. La cuantificación de SA y OA se realizó mediante la elaboración de curvas patrón con estándares a diferentes concentraciones.

3.9. Tinción con tetrazolio y visualización de la permeabilidad de la semilla

Se añadieron 750 µl de solución de tinción de cloruro de trifenil tetrazolio al 1% al tubo Eppendorf® que contenía las semillas y se envolvió en papel de aluminio para mantenerlo en oscuridad por 3 días (Niñoles et al., 2023). A los 3 días se observaron en el Macroscopio Leica DMS 1000 con iluminación diascópica para valorar la permeabilidad mostrada mediante la tinción. El color se cuantificó resuspendiendo las semillas teñidas en 1ml de etanol, homogenizándolas, para posteriormente centrifugar la muestra durante 7 minutos a 15.000 rpm y medir la absorbancia a 480nm del sobrenadante.

3.10. Análisis estadístico

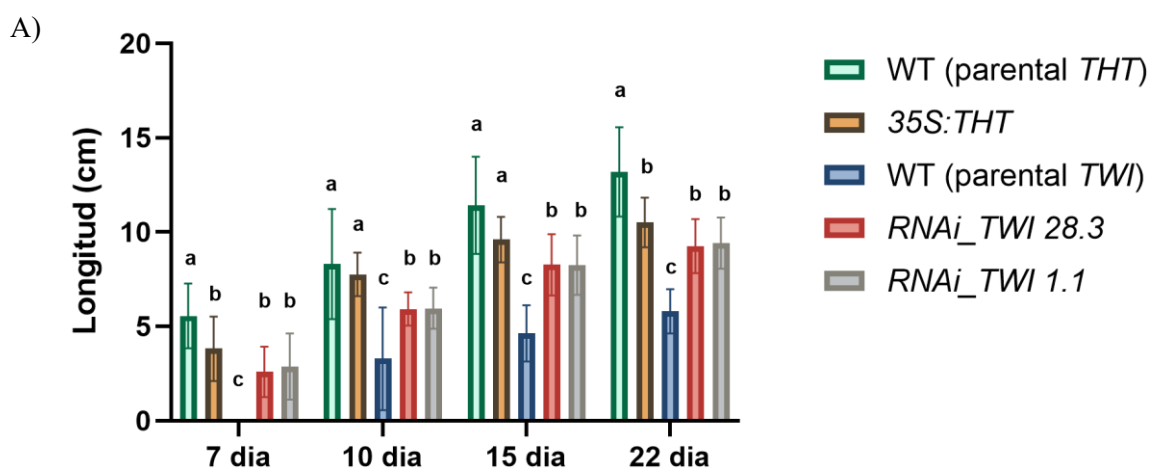
Se empleó el análisis de varianza, específicamente la prueba estadística One Way Anova, para examinar las posibles diferencias significativas entre los distintos genotipos y tratamientos utilizados en los resultados obtenidos. Se evaluaron las comparaciones de medias por el método Fisher. Se consideró que un valor $p < 0.05$ indicaba significancia estadística. Para llevar a cabo el análisis estadístico, se utilizó el software Minitab 19 para Windows. Los gráficos fueron elaborados utilizando el programa gráfico Graphpad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

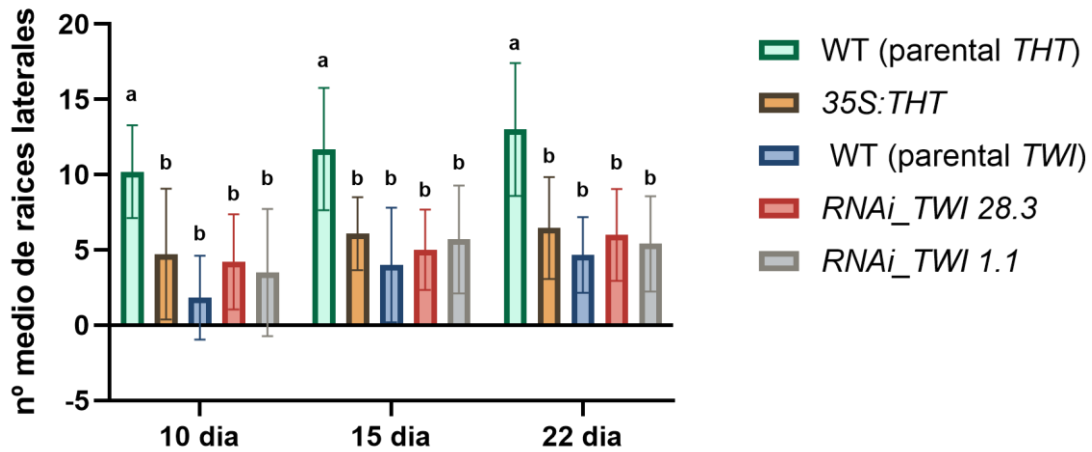
4.1. Caracterización fenotípica de las raíces de las plantas transgénicas *35S:THT* y *RNAi_TWI*

Se ha descrito tanto el papel de las HCAAs en la respuesta defensiva en raíces (Ren et al., 2016; Politycka y Bednarsk, 2004) como la acumulación del flavonoide escopoletina en raíz (Buschmann et al., 2000; Bednarek et al., 2005; Kai et al., 2006). Por otra parte, resultados previos en nuestro laboratorio parecían indicar que las plantas transgénicas *RNAi_TWI*, con niveles alterados de flavonoides (Campos et al, 2019) presentaban un mayor desarrollo radicular que las parentales (Fuentes, 2017). Por todo ello, nos planteamos determinar el papel de HCAAs y los flavonoides en el desarrollo y crecimiento de la raíz, así como en su estructura. Para ello, se procedió a realizar una caracterización fenotípica de plantas transgénicas con niveles alterados de estos metabolitos, evaluando la longitud de la raíz principal, su crecimiento y el desarrollo de raíces laterales, tanto en cultivo *in vitro*, como *in vivo* en condiciones de invernadero.

Para evaluar estos parámetros se cultivaron simultáneamente semillas *in vitro* de las plantas transgénicas *35S:THT* (línea 7.3), *RNAi_TWI* (líneas 1.1 y 28.3), así como de sus respectivos parentales (ver en materiales y métodos apartado 3.2) y se midió la longitud de la raíz principal a diferentes tiempos (Figura 3A). Además, se cuantificó el número de raíces laterales que brotan de la raíz principal a diferentes tiempos (Figura 3B) para determinar la influencia en el crecimiento horizontal y la densidad de las raíces de las plantas transgénicas. Con el fin de estudiar el desarrollo de las raíces principales en condiciones *in vivo*, las plántulas que habían estado sembradas *in vitro* se trasplantaron a macetas en el invernadero y se evaluó la longitud de la raíz principal después de 48 días (Figura 3C) para determinar si el comportamiento observado es propio de estadios tempranos del crecimiento y desarrollo o bien del propio método de cultivo.



B)



C)

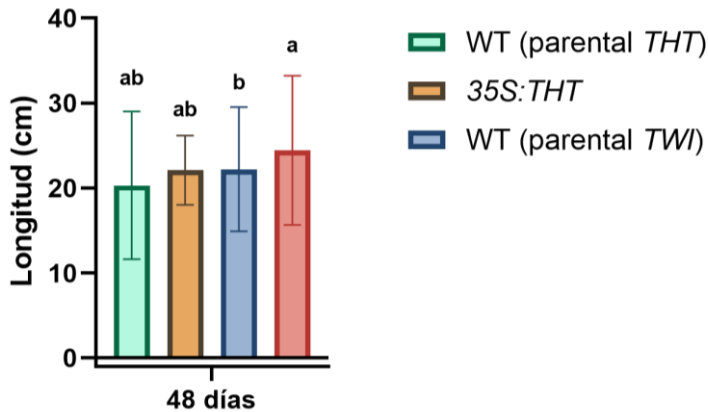


Figura 3. A) Longitud de la raíz principal *in vitro* B) Número de raíces laterales *in vitro* C) longitud de la raíz principal en las plantas transgénicas *35S:THT*, *RNAi_TWI* 28.3, *RNAi_TWI* 1.1 y sus respectivos fondos genéticos WT (parental *THT*) y WT (parental *TWI*), a diferentes tiempos tras su siembra en cultivo *in vitro*. Los datos se expresan como promedio \pm DE de trece plantas independientes de un experimento representativo. Los datos se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher; diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Como se aprecia en la Figura 3A, las plantas transgénicas que sobrexpresan el gen *THT* presentaron una reducción estadísticamente significativa de la longitud de su raíz principal con respecto a su parental en el primer tiempo analizado (7 días). Dicha diferencia desaparece a medida que las plántulas se fueron desarrollando en el tiempo, aunque se mantuvo la tendencia de que las raíces de las plantas que acumulan un mayor contenido de HCAAs son de menor tamaño. A los 22 días se observa nuevamente cómo las plantas *35S:THT* reducen significativamente la longitud de la raíz respecto a su parental. Por el contrario, ambas líneas transgénicas *RNAi_TWI* mostraron un aumento significativo de la longitud de la raíz respecto a su parental WT en todos los tiempos analizados.

Previas investigaciones habían detectado que la aplicación de compuestos fenólicos y tratamientos con derivados de estos como el ácido salicílico (SA) y el ácido ferúlico frente a situaciones de estrés generan una disminución en los efectos fisiológicos negativos de respuesta de la planta (Kaur et al., 2017). Sin embargo, también se ha sugerido que los compuestos fenólicos inhiben la tasa de germinación de semillas y alteran la longitud de la raíz y la biomasa de diferentes especies (Khawula et al., 2024). Estos resultados coinciden con los nuestros puesto que pese al gran potencial que tiene el mayor contenido en compuestos fenólicos frente a situaciones de estrés, en condiciones normales de crecimiento este mayor gasto energético y de recursos en la producción de HCAAs podría ralentizar el desarrollo longitudinal de la raíz, obteniendo una menor longitud de esta.

Por otra parte, se ha descrito que cambios transcripcionales inducidos por flavonoides en los genes relacionados con la señalización de auxinas reducen la elongación celular en las raíces del arroz (Xu et al., 2019) y que algunos flavonoides reprimen la división celular asimétrica de las raíces mediante la regulación del meristemo radicular mediada a través del factor de transcripción *NUTCRACKER* (*NUC*) (Huang et al., 2021), teniendo un efecto significativo en el desarrollo de las raíces afectando principalmente al crecimiento de las raíces primarias por la alteración de la señalización celular (Franco et al., 2015) y la distribución de auxinas en las raíces (Zhang et al., 2021). Podemos en consecuencia observar que alteraciones en los niveles de flavonoides podrían favorecer el crecimiento de la raíz, reafirmando esta relación entre el contenido de flavonoides y la longitud de la raíz principal en tomate. Estos resultados confirman los resultados preliminares previamente obtenidos por nuestro grupo (Fuentes, 2017).

Además de la disminución en la longitud de la raíz principal, las plantas transgénicas *35S:THT* mostraron una reducción significativa en la abundancia de raíces laterales en respecto a su parental en todos los tiempos analizados, 10, 15, y 22 días (Figura 3B). La acumulación constitutiva de HCAAs en estas plantas transgénicas, en hojas, flores y frutos está correlacionada con una mayor resistencia a la infección bacteriana provocada por *Pst*. Los HCAAs refuerzan la pared celular, actuando como barrera física contra patógenos y contribuyendo a la síntesis de SA, lo cual activa genes de defensa en la planta (Campos, et al., 2014). Su incorporación en la fracción insoluble de la pared celular como ésteres contribuye significativamente al engrosamiento de la pared celular. Los compuestos fenólicos unidos a la pared actúan como reservas de unidades de fenilpropanoides esenciales para la biosíntesis de lignina, iniciando procesos de lignificación. El engrosamiento de la pared celular, facilitado por estos ésteres de HCAAs, mejora la integridad estructural y la rigidez de la pared celular, lo que refuerza la planta contra el estrés biótico. Este refuerzo estructural crea una barrera física más robusta contra patógenos, dificultando su penetración y propagación dentro de los tejidos vegetales (Khawula et al., 2024). Dicho engrosamiento en la pared celular fruto de la acumulación constitutiva de las HCAAs en las transgénicas *35S:THT* resulta en un menor desarrollo de raíces laterales y como se ha podido observar en las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *THT*, una raíz principal de menor tamaño.

Para el caso de las líneas transgénicas *RNAi_TWI* no se observaron diferencias significativas en el número de raíces laterales con respecto a su parental, indicando que la alteración en los niveles de flavonoides parece afectar únicamente a la longitud de la raíz principal.

En condiciones de cultivo *in vivo* (Figura 3C) las diferencias significativas observadas con anterioridad en condiciones de cultivo *in vitro* se atenúan. A los 48 días de crecimiento y en condiciones de cultivo *in vivo*, no se observan diferencias significativas entre la línea transgénica 35S:*THT* con respecto a su parental. Sin embargo, la línea *RNAi_TWI* 28.3 sigue manteniendo el fenotipo observado en condiciones de cultivo *in vitro*, es decir, las plantas transgénicas muestran un aumento significativo de la longitud de la raíz principal respecto a su parental, reafirmando la función que previamente se ha descrito de los flavonoides en el crecimiento y desarrollo de la raíz.

Por tanto, nuestros resultados parecen indicar que *Twil* juega un papel importante en el desarrollo de la raíz. En el futuro, sería de interés medir los niveles de los sustratos y productos de este enzima en dicho tejido, tanto en las líneas transgénicas como en sus parentales.

4.2. Estudio de longevidad de las semillas de las plantas transgénicas 35S:*THT* y *RNAi_TWI*

La longevidad de las semillas es un factor crítico para la conservación de especies vegetales, la agricultura y la biodiversidad global. Comprender los mecanismos que influyen en la capacidad de las semillas para permanecer viables durante largos períodos, es esencial para mejorar las prácticas de almacenamiento y asegurar una germinación exitosa. Se ha descrito que tratamientos con HCAAs tienen efecto inhibitorio sobre la germinación de semillas de lechuga y tomate (Cutillo et al., 2003). Por su parte, los flavonoides juegan un papel fundamental en la longevidad de las semillas (Niñoles 2023). Así pues, se investigó la viabilidad de semillas transgénicas 35S:*THT* y *RNAi_TWI* para identificar el posible papel de las HCAAs o los flavonoides en este proceso. Para ello, se simuló el envejecimiento de las semillas transgénicas mediante un tratamiento de envejecimiento acelerado, analizando su deterioro y viabilidad en comparación con sus parentales. Este enfoque permitió determinar la existencia y el impacto de estos compuestos en la longevidad de las semillas.

El tratamiento de envejecimiento acelerado se optimizó para poder observar diferencias en el daño provocado entre las muestras (Ver apartado 3.6 de Materia y Métodos).

Las semillas deterioradas fueron sometidas a dos tipos de análisis. El primero de ellos fue una tinción con una solución incolora y acuosa de cloruro 2,3,5-trifenil tetrazolio al 0,1% con la finalidad de observar su deterioro, dicha tinción se basa en la permeabilidad de la semilla al paso de este indicador incoloro al interior ya que dicha permeabilidad aumenta como consecuencia del envejecimiento de la semilla, en el interior el tetrazolio se reduce a formazán rojo por la actividad de las deshidrogenasas. Por tanto, aquellas semillas con mayor coloración roja son aquellas más deterioradas por el envejecimiento. Se analizaron las semillas de todos los genotipos con el fin de ver diferencias de tinción entre transgénicas y sus parentales con mismo tiempo de exposición al tratamiento. (Figura 4).

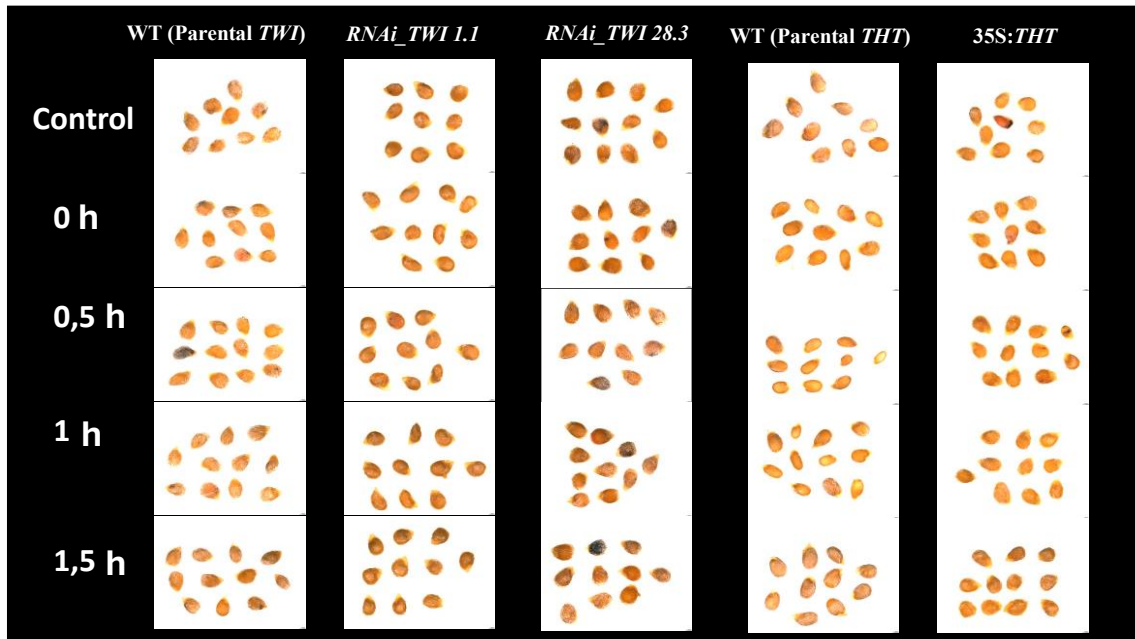


Figura 4. Tinción de tetrazolio cualitativa. Se representan fotos tomadas en lupa de WT (parental THT), 35S:THT, WT (parental TWI), RNAi_TWI 1.1 y RNAi_TWI 28.3 así como sus respectivos controles para una exposición de tratamiento de envejecimiento acelerado de 0.5 , 1 y 1.5 horas, así como su correspondiente control.

Las tinciones indican que las plantas transgénicas 35S:THT no mostraron diferencias frente a su fondo genético mientras que las RNAi_TWI 1.1 y RNAi_TWI 28.3 están más deterioradas en todos los tiempos analizados. Para evidenciar este fenotipo, se realizó una cuantificación de la tinción midiendo la absorbancia a 480 nm de las plantas RNAi_TWI 1.1 y RNAi_TWI 28.3 tras 0,5h de exposición al tratamiento (Figura 5).

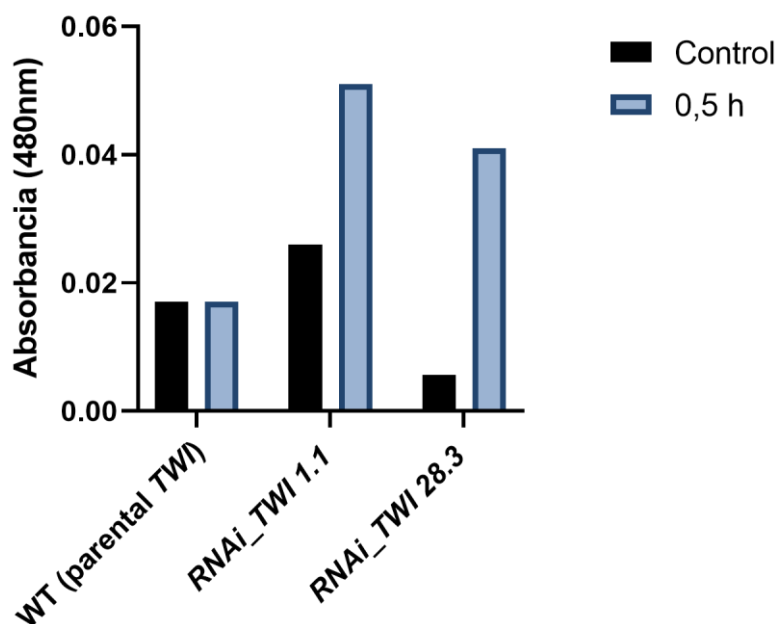
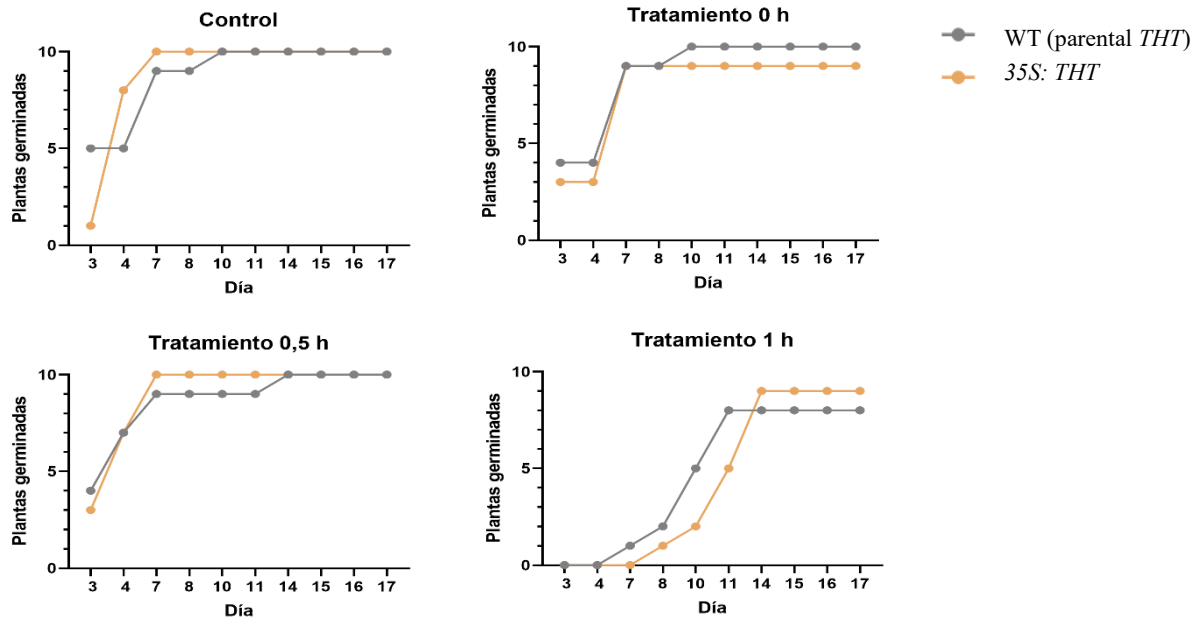


Figura 5. Tinción de tetrazolio cuantitativa. Se representan valores de absorbancia a 480nm de las líneas WT (parental TWI), RNAi_TWI 1.1 y RNAi_TWI 28.3 para una exposición de tratamiento de envejecimiento acelerado de 0.5 (azul) horas, así como su correspondiente control, cada columna refleja una medida individual.

Se observó que las semillas transgénicas TWI mostraban notablemente mayor absorbancia que el parental no transgénico, lo cual confirma que han sufrido un mayor deterioro.

Respecto al segundo análisis se estudió el rendimiento de germinación de las semillas afectadas por los distintos tratamientos de envejecimiento con el fin de determinar por comparación entre aquellas con índices de germinación diferenciales que componentes son claves en la longevidad de la semilla.

A)



B)

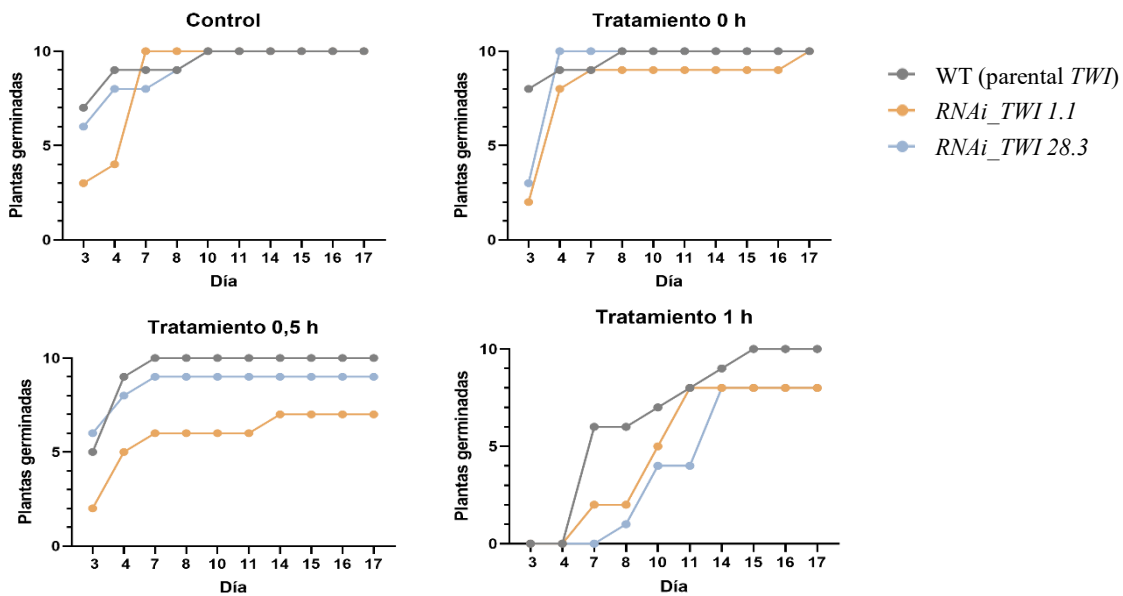


Figura 6. Tasa de semillas germinadas bajo diferentes tratamientos de AAT y un control. A) El gráfico muestran el número de semillas germinadas sobre 10 en función del tiempo en días para distintos genotipos: WT (parental *THT*) y 35S:*THT* respecto a un tratamiento de 0, 0.5 y 1 horas respectivamente y un control sin tratar. B) El gráfico muestran el número de semillas germinadas sobre 10 en función del tiempo en días para distintos genotipos: WT (parental *TWI*), *RNAi_TWI 1.1* y *RNAi_TWI 28.3* respecto a un tratamiento de 0, 0.5 y 1 horas respectivamente y un control sin tratar. Las curvas de cada genotipo indican la tasa y el tiempo de germinación bajo cada condición específica.

En la Figura 6 se muestra la tasa de germinación de las semillas tras 0, 0,5 y 1 hora de tratamiento de envejecimiento ya que después de 1,5h ninguna semilla pudo germinar (datos no mostrados). Los resultados indican que la capacidad de germinación se retrasa en el tiempo y decrece proporcionalmente con mayor exposición al tratamiento, siendo muy similares el tiempo 0 y el control y que los tratamientos efectivos para observar diferencias entre las diferentes líneas fueron a 0,5 y 1 hora. Las semillas transgénicas *THT*

(Figura 6 A) actuaron de forma muy similar a su parental, sugiriendo que las HCAAs no juegan un papel predominante asociado a la longevidad de la semilla. Estos resultados concuerdan con la ausencia de deterioro de las semillas observada tras el tratamiento de envejecimiento (Figura 4). Sin embargo, las semillas transgénicas de las líneas *TWI* mostraron tendencia a poseer una capacidad de germinación menos efectiva y más tardía tras 0,5 y 1 hora de tratamiento como se observa en la Figura 6 B donde la curva de las semillas *TWI 28.3* es ligeramente y la *TWI 1.1* notablemente inferior en todo su recorrido al control. Estas observaciones están estrechamente relacionadas con el fenotipo de deterioro obtenido tras 0,5 horas del tratamiento de envejecimiento de las semillas (Figuras 4 y 5). Estos resultados se respaldan en anteriores estudios que han puesto de manifiesto el papel de los flavonoides en la longevidad de la semilla (Debeaujon et al., 2000). Este rol se ha asociado principalmente con su poder antioxidante y su capacidad para eliminar ROS, mitigando el estrés oxidativo y favoreciendo la longevidad, similar a otros compuestos encontrados en la testa de las semillas de leguminosas, como el glutatión y los tocoferoles (Rao et al., 2023; Ramtekey et al., 2022). Por otra parte, estudios recientes han propuesto nuevas vías de actuación por las cuales los flavonoides pueden participar en la longevidad, en particular las proantocianidinas, que se acumulan en las vacuolas durante el desarrollo temprano de la semilla y están codificadas por genes como *transparent testa 10 (tt10)*, formando parte de la cutícula asociada al endospermo y de la capa subepidérmica de las semillas (Ramtekey et al., 2022), capas que se han demostrado esenciales para la impermeabilidad y longevidad de las semillas. Por otra parte, estudios han observado en los mutantes *transparent testa 7 (tt7)* una drástica reducción en la longevidad de las semillas debido a defectos específicos en la capa externa del tegumento (Niñoles et al., 2023), que incluyen una severización inadecuada y la acumulación de almidón. Estos defectos se deben principalmente a la sobreacumulación de kaempferol-3-rhamnósido, lo que indica que niveles excesivos de este compuesto pueden ser perjudiciales para el desarrollo y la longevidad de las semillas (Niñoles et al., 2023).

Así pues, nuestros resultados parecen indicar que *Twil* juega un papel importante en los procesos de longevidad de las semillas, destapando una nueva función de esta glicosiltransferasa. En el futuro, sería de interés medir los niveles de los sustratos y productos de este enzima en semillas de plantas transgénicas y control, sometidas o no a procesos de envejecimiento.

4.3. Análisis de los niveles de expresión de genes implicados en la ruta de biosíntesis de serotonina y melatonina en plantas de tomate sometidas a diferentes tipos de estrés

La serotonina y la melatonina son dos compuestos bioactivos que desempeñan roles esenciales en la regulación del crecimiento, desarrollo y respuesta a diferentes estreses en las plantas (Kumar et al., 2021). La capacidad de estas moléculas para modular la respuesta de las plantas a condiciones adversas sugiere su importancia en la adaptación y supervivencia vegetal. Por ello resultó de gran interés estudiar la actividad de la ruta metabólica que produce serotonina y melatonina en tomate.

Para analizar individualmente el papel de la serotonina y la melatonina en diferentes situaciones de estrés, se sometieron plantas de tomate de la variedad Money Maker a diferentes tipos de estrés y se analizó la expresión relativa del gen de la triptofano descarboxilasa (*TDC*) mediante qRT-PCR. Este gen codifica el enzima que cataliza la producción de triptamina, precursora de la serotonina, a partir de triptófano (Figura 2). La familia de los genes *TDC* la conforman 4 genes diferentes, para este trabajo se decidió estudiar la expresión relativa del gen *TDC2* únicamente, ya que este es el único que se expresa principalmente en la hoja (University of Toronto. (2023), ePlant Tomato) (Commisso et al., 2022).

Con el fin de conocer la modulación de *TDC2*, y por tanto el papel de la serotonina o melatonina frente a estrés de tipo abiótico se analizó la respuesta de *TDC2* por choque térmico con altas temperaturas (Figura 7A) y respuesta por herida (Figura 7B), con la finalidad de determinar si este gen juega un rol en la respuesta a estrés abiótico

Además de estudiar el papel de la serotonina y melatonina frente a estreses de tipo abiótico, también investigamos su participación en estrés de tipo biótico. Para ello, se infectaron plantas de tomate de la variedad Rio Grande con la cepa virulenta (ΔPst) o avirulenta (*Pst*) de la bacteria *Pst*, que dan lugar a una interacción de tipo compatible en la que la planta enferma o una interacción incompatible en la que la planta resiste a la colonización de la bacteria, respectivamente (Figura 7C).

De igual manera, para conocer la participación de la serotonina en respuesta a infecciones viroidales, se evaluó el nivel de expresión de *TDC2* en plantas de tomate sometidas a una infección con el viroide de la Exocortis de los Cítricos (CEVd; Figura 7D). (Prol et al., 2021).

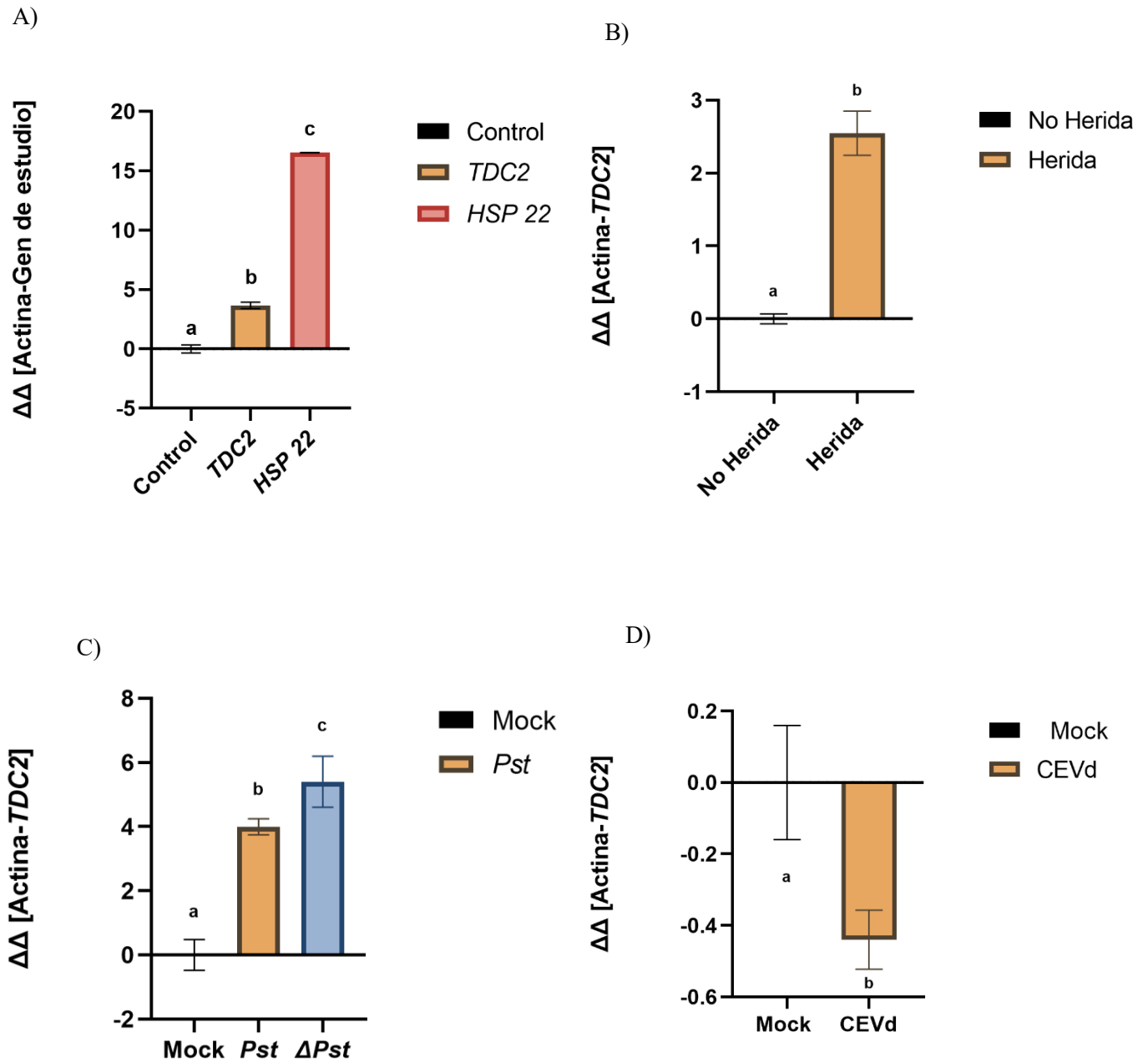


Figura 7. Análisis por RT-qPCR de la expresión del gen *TDC2* en A) en plantas Money Maker sometidas a un tratamiento de calor de 45°C durante 2h y no sometidas (Control). B) plantas Money Maker heridas y no heridas. C) plantas de tomate Rio Grande inoculadas con la cepa bacteriana avirulenta (*Pst*), virulenta *Pst* (ΔPst) y sin el patógeno (Mock) D) plantas Money Maker infectadas por viroide y no infectadas (Mock). Los niveles de expresión son relativos a las plantas de tomate Mock y normalizados al gen de actina del tomate tras 24 horas de la inoculación. Los datos se obtuvieron de tres plantas independientes y se expresan como promedio \pm DE de las tres replicas técnicas de un experimento representativo. Se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher; diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Como se puede observar en la Figura 7A, la expresión relativa del gen *TDC2*, aumenta significativamente después de someter a las plantas a un estrés por calor. En este experimento se añadió el análisis del gen *HSP22* (Heat Shock Protein 22) cuya función es ofrecer protección contra el choque térmico por calor y descrito como gen inducible por calor (Mizoi et al., 2023) como control positivo. Estudios previos han analizado el efecto de tratamientos exógenos con serotonina y melatonina frente a estrés térmico y han demostrado que estos compuestos favorecen la proliferación celular al estimular la división y el crecimiento de las células (Kumar et al., 2021). Esta proliferación celular ayuda a reparar tejidos dañados. Además, modulan la hormona etileno (ET) que interactúa en la síntesis de isoflavonas (Kumar et al., 2021) compuestos que desempeñan un papel crucial en la protección de las plantas bajo estrés térmico actuando como antioxidantes y estabilizadoras de membranas celulares, lo que contribuye a su integridad y funcionalidad

Como muestra la Figura 7B, hay una inducción del gen *TDC2* tras la herida, por lo que se puede deducir que la síntesis de serotonina está promovida en situaciones de estrés por daño mecánico. Del mismo modo que para el caso de las bacterias, este resultado se puede asociar a su función antioxidante que ayudan a neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hayashi et al., 2016), protegiendo las células vegetales del estrés oxidativo inducido por el daño mecánico y también contribuyendo a la estabilidad de las membranas celulares, reduciendo la peroxidación lipídica y manteniendo la integridad estructural de las células bajo condiciones estresantes (Zahra et al., 2024). Anteriormente se ha descrito que la aplicación de serotonina a cortes vegetales puede actuar como un compuesto anti-pardeamiento en cultivares de manzana (*Malus domestica Borkh*) 'Gala' y 'Fuji', mediante la reducción de la expresión y actividad de la polifenol oxidasa (PPO) (Bajwa et al., 2015). El pardeamiento ocurre cuando compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, ácido cafeico y epicatequina se oxidan a quinonas a través de la acción de la PPO. Normalmente, esta no puede reaccionar con estos fitoquímicos debido a que está localizada en diferentes partes de la célula vegetal donde no puede tener acceso directo a estos sustratos. Sin embargo, durante la abrasión o la ruptura de los compartimentos celulares, la PPO puede oxidar los compuestos fenólicos convirtiéndolos en o-quinonas. Estas o-quinonas pueden luego reaccionar con proteínas cercanas para formar melanina, un pigmento negro que es responsable del característico efecto de pardeamiento en frutas y vegetales (Erland et al., 2016). Investigaciones han demostrado que la serotonina puede actuar como sustrato del enzima ácido cafeico O-metiltransferasa, lo que subraya su papel central en la regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides relacionados con la defensa y adaptación de las plantas ante el estrés mecánico (Byeon et al., 2014). Además, la serotonina actúa como sustrato de la amina aromática para la formación de las HCAAs cumarolilserotonina (CS) y feruloilserotonina (FS). Las HCAAs desempeñan roles cruciales en el crecimiento, desarrollo y respuesta al estrés de las plantas, en concreto participando en el daño mecánico (Campos et al., 2014).

La Figura 7C muestra una inducción significativa de la expresión del gen *TDC2* tras ambas infecciones, siendo mayor en aquellas infectadas con la cepa de la bacteria virulenta, este hecho puede deberse a que esta infección alcanza mayor severidad, produciendo un mayor daño celular por lo que la acción de la serotonina es más necesaria y que esta ruta parece no ser inhibida por la interacción compatible del patógeno capaz de suprimir las defensas de la planta. Por tanto, podemos intuir que esta molécula también

tiene un papel en la defensa biótica contra bacterias, esto cobra sentido teniendo en cuenta sus funciones anteriormente mencionadas como antioxidante ya que es una propiedad de gran utilidad durante la infección. Investigaciones previas en arroz frente una infección por el hongo *Magnaporthe oryzae* (Hayashi et al., 2016) mostraron que la serotonina no es una molécula de fin de ruta y que a partir de ella además de melatonina derivan otros compuestos como la feruloilserotonina, coumaroilserotonina, caffeoilserotonina y cinnamoilserotonina, HCAAs que juegan roles importantes en la defensa contra patógenos reforzando las paredes celulares y produciendo sustancias antimicrobianas, mejorando la resistencia de la planta (Dharmawardhana et al., 2013; Kang et al., 2009). Por otra parte, estudios han demostrado que plantas que no pueden hidroxilar la triptamina para producir serotonina muestran un daño más severo frente a la reacción de resistencia, sugiriendo que la serotonina minimiza el daño de la respuesta hipersensible y a suprimir la expansión de las lesiones (Hayashi et al., 2016).

Como muestra la Figura 7D, se detectó una represión significativa del gen *TDC2* en las plantas infectadas por CEVd respecto a las no infectadas (Mock). Estos resultados pueden asociarse a varias causas, teniendo en cuenta la acción defensiva previamente descrita de la molécula de serotonina, la inhibición de un gen responsable de su biosíntesis durante la infección de viroide podría derivarse de estrategias propias de estos organismos, como alterar las rutas de señalización que controlan la respuesta defensiva, donde se encuentra la serotonina como eslabón de dicha cadena de comunicación y pueden afectar directamente la expresión de genes de la planta mediante la interferencia con el RNA (Joubert et al., 2022). Los viroides pueden manipular estos niveles hormonales para crear un ambiente más favorable para su replicación, lo cual podría incluir la represión de la síntesis de serotonina para modificar la respuesta defensiva de la planta (Joubert et al., 2022). Durante la infección, los viroides también pueden afectar a los transportadores de aminoácidos (Joubert et al., 2022), redirigiéndolos hacia otras rutas que favorecen la replicación del viroide, en detrimento de la síntesis de serotonina, cuyo precursor es el triptófano (S. Kang et al., 2007).

Por último, con el fin de estudiar el efecto de la administración exógena de estos compuestos sobre la producción endógena de los mismos, se realizaron tratamientos con serotonina y melatonina para determinar así su dinámica de actuación y su actividad reguladora. En la Figura 8 se muestran los niveles de expresión analizados tanto del gen *TDC2*, directamente relacionado a la producción de serotonina, como del gen *serotonina N-acetiltransferasa (SNAT)*, intermediario de la formación de melatonina a través de la serotonina (Figura 2).

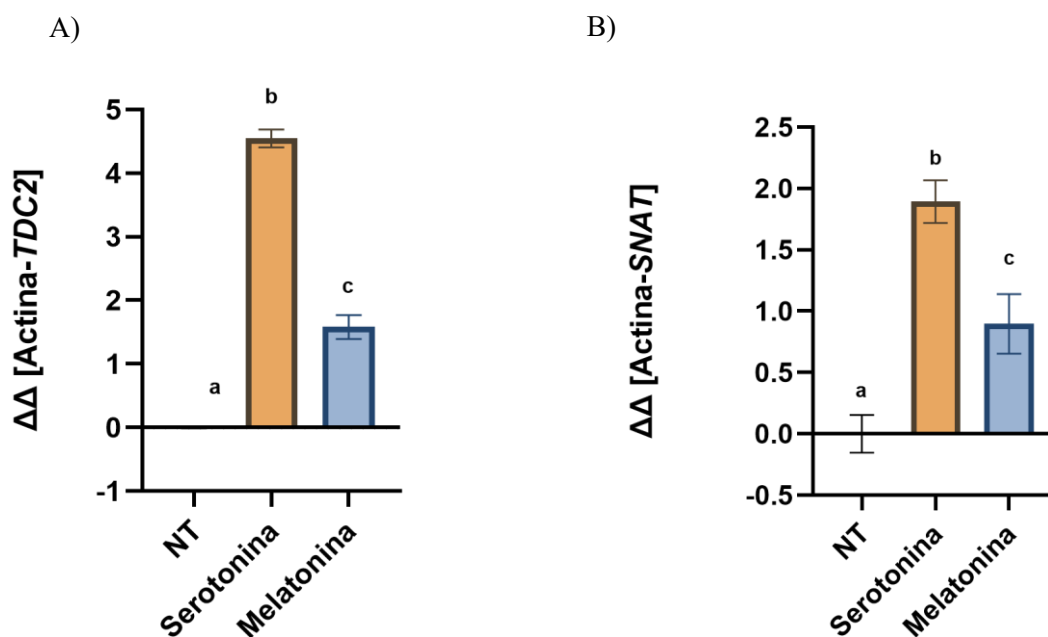


Figura 8. Análisis por RT-qPCR, en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o Melatonina 100 mM (Melatonina), de la expresión del gen A) *TDC2* B) *SNAT*, Los niveles de expresión son relativos a las plantas de tomate no tratadas y normalizados al gen de actina del tomate. Los datos se obtuvieron de tres plantas independientes y se expresan como promedio \pm DE de las tres replicas tecnicas de un experimento representativo. Se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher; diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Los análisis indican que los tratamientos exógenos por pulverización de serotonina y melatonina promueven una inducción diferencial en la expresión de los genes *TDC2* (Figura 8A) y *SNAT1* (Figura 8B) relacionados con la síntesis de serotonina y melatonina, respectivamente, siendo mayor la inducción producida por la serotonina. Estos resultados sugieren una regulación positiva por ambos compuestos, siendo mayor la ocasionada por el tratamiento con serotonina exógena. Este tipo de regulación puede explicarse porque el papel antioxidante y defensivo de estos compuestos frente al estrés requiere una producción rápida y cuantiosa en respuesta a una señal de alarma, para enfrentar eficazmente el estrés ocasionado.

4.4. Estudio de la activación de la respuesta defensiva tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina en plantas de tomate

Una vez estudiada la activación de la ruta de biosíntesis de serotonina y melatonina tras distintos tipos de estreses de tipo biótico, se procedió al estudio de la posible activación de la respuesta defensiva de las plantas de tomate mediada por ambos metabolitos. Para ello, se realizaron tratamientos exógenos con serotonina y melatonina y, en primer lugar, se analizó la expresión de diferentes genes defensivos (*THT*, *CAT*, *POD*, *S5H* y *PRI*) y a continuación, se midieron los niveles de los ácidos salicílico y genticóico, moléculas señal de la respuesta defensiva en plantas de tomate.

4.4.1. Análisis de los niveles de expresión de genes defensivos tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina en plantas de tomate

Debido a la relación de la serotonina como precursor de la formación de los HCAAs previamente mentada (Macoy et al., 2015), se decidió determinar el efecto de tratamientos exógenos de serotonina y melatonina sobre la expresión del gen *THT* (Figura 9), involucrado en esta misma ruta, con el fin de comprobar si dichos tratamientos pueden favorecer la producción de HCAAs y por consecuencia obtener los resultados asociados a su acumulación (Campos et al., 2014),

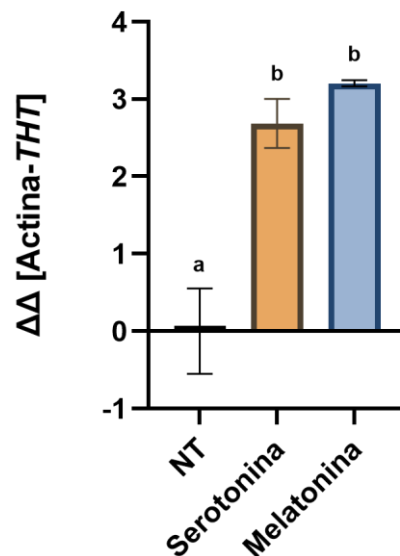


Figura 9. Análisis por RT-qPCR en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina), de la expresión del gen *THT*. Los niveles de expresión son relativos a las plantas de tomate no tratadas y normalizados al gen de actina del tomate. Los datos se obtuvieron de tres plantas independientes y se expresan como promedio \pm DE de las tres replicas técnicas de un experimento representativo. Se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher; diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Como muestra la Figura 9, se observa un notable aumento de la expresión del gen *THT* tanto en los tratamientos con serotonina como en melatonina. La serotonina, junto con otras monoaminas biógenas como la triptamina y la tiramina, se conjugan con compuestos fenólicos formando amidas de ácidos hidroxicinámicos (HCAAs), como la feruloilserotonina (FS), feruloiltiramina (FT) y cafeoiltriptamina sintetizadas por la enzima serotonina N-hidroxicinamoiltransferasa (*THT*) (Ly et al., 2008). Por lo tanto, podemos observar que el estímulo producido por la serotonina exógena puede actuar como una señal de estrés o daño, desencadenando respuestas defensivas que incluyen la síntesis de compuestos defensivos como las HCAAs. Además, la presencia de serotonina exógena puede asimilarse y servir como un precursor directo en la biosíntesis de estos compuestos, facilitando su formación. Respecto a la inducción significativa de *THT* observada tras el tratamiento con melatonina podría asociarse al *feedback* positivo descrito anteriormente por el cual un incremento en la melatonina estimula la producción de serotonina (Figura 8), la cual actúa de precursor no únicamente en la producción de más melatonina sino también de otras de sus rutas como la producción de HCAAs.

Dado el conocido poder antioxidante propio de la serotonina y melatonina (Gülçin, 2008) y como anteriormente se ha referido como compuesto anti-pardeamiento (Bajwa et al., 2015), se estudió la expresión de los genes *CAT* y *POD* tras tratamientos exógenos de serotonina y melatonina (Figura 10). Los genes *CAT* (catalasa) y *POD* (peroxidasa) son cruciales en la defensa antioxidante de las plantas, ayudando a protegerlas del daño oxidativo causado por diversos tipos de estrés. La catalasa descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, mientras que las peroxidasas utilizan el peróxido de hidrógeno para oxidar diversos sustratos, participando en la detoxificación de ROS.

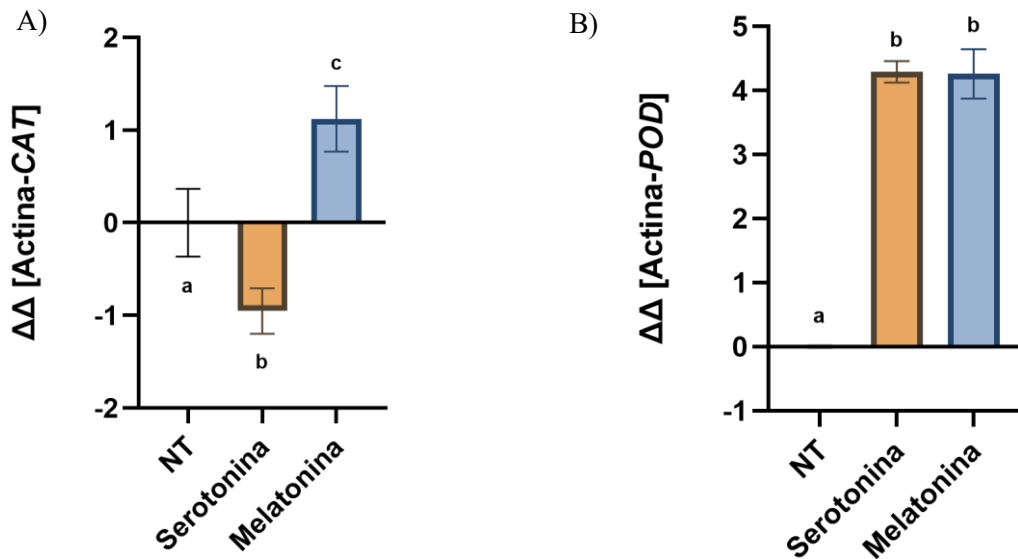


Figura 10. Análisis por RT-qPCR en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o Melatonina 100 mM p (Melatonina), de la expresión del gen A) *CAT* y B) *POD*. Los niveles de expresión son relativos a las plantas de tomate no tratadas y normalizados al gen de actina del tomate. Los datos se obtuvieron de tres plantas independientes y se expresan como promedio \pm DE de las tres replicas técnicas de un experimento representativo. Se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher; diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Los resultados que muestran la Figura 10 determinan que ambos tratamientos tienen un efecto significativamente positivo sobre la expresión del gen *POD* (Figura 10B), mientras que para el gen *CAT* pese a que ambos tratamientos alcanzan niveles de expresión significativamente diferentes al control, los tratamientos de serotonina reducen la expresión de este gen mientras que los de melatonina la inducen (Figura 10A). Los resultados correspondientes a los tratamientos de melatonina apoyan investigaciones previas que mostraron la inducción de estos mismos genes tras tratamientos similares en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) (Luo et al., 2023) y en semillas de pepino (Zhang et al., 2014). Por otro lado, el papel de la serotonina en la respuesta frente a la oxidación se ha planteado como antioxidante por sí mismo, aunque con menor poder que la melatonina (Kaur et al., 2015), pero mayoritariamente como un precursor de las potentes antioxidantes HCAAs, como la CS y FS identificadas en el aceite de cártamo (Hotta et al., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos apuntan a que quizás puedan tener un papel modulador favoreciendo la expresión de las peroxidasas, pero inhibiendo el de las catalasas.

Con el fin de analizar la activación de la respuesta defensiva tras los tratamientos exógenos con serotonina y melatonina, se analizó la expresión de los genes defensivos *PR1* y *S5H* (Figura 11). Los genes *PR1* y *S5H* juegan roles importantes en la respuesta de defensa del tomate. El gen *PR1* actúa como un marcador clave de la respuesta sistémica adquirida (SAR), aumentando la resistencia del tomate a una amplia gama de patógenos, incluidos hongos, bacterias y virus. Esta defensa se activa principalmente en respuesta al ácido salicílico (SA) (López-Gresa et al., 2016). Por otro lado, el gen *S5H* codifica el enzima salicílico ácido 5-hidroxilasa, que cataboliza el SA a ácido gentísico (GA) hidroxilando la posición 5 para regular sus niveles en la planta (Payá et al., 2022).

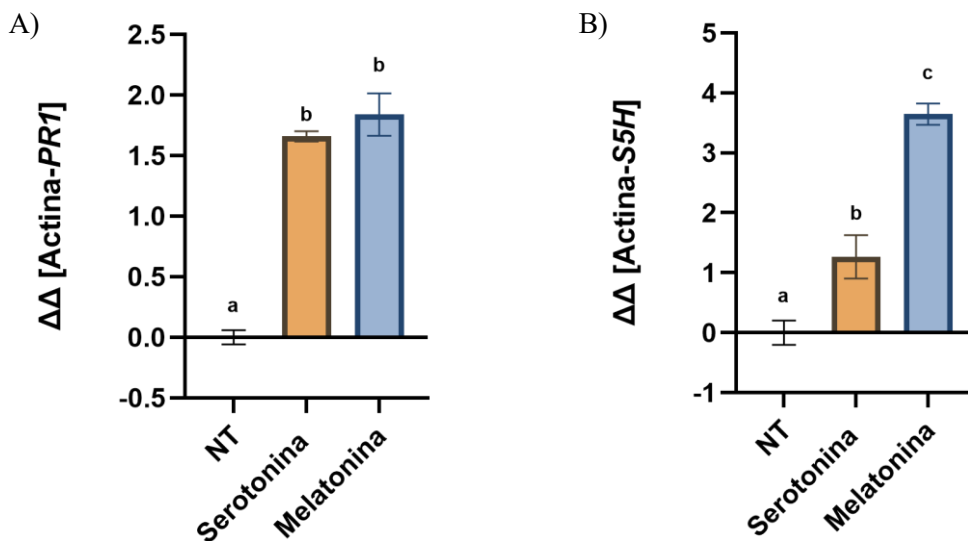


Figura 11. Análisis por RT-qPCR, en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina), de la expresión del gen C) *PR1* D) *S5H*. Los niveles de expresión son relativos a las plantas de tomate no tratadas y normalizados al gen de actina del tomate. Los datos se obtuvieron de tres plantas independientes y se expresan como promedio \pm DE de las tres replicas tecnicas de un experimento representativo. Se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher; diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Podemos ver que ambos tratamientos inducen significativamente con una magnitud similar la expresión del gen *PR1*, mientras que hay una mayor inducción de la expresión del gen *S5H* tras el tratamiento con melatonina. Se ha descrito el papel de la melatonina en la respuesta al estrés biótico utilizando mutantes de *Arabidopsis thaliana* donde observaron una inducción de la expresión del gen *PR1* por tratamientos de melatonina y establecieron que la melatonina podría actuar como un marcador de la respuesta inmune innata mediada por SA en plantas (Lee et al., 2014).

Posteriormente este mismo grupo desarrolló un modelo para *Arabidopsis thaliana* que explica que la melatonina regula y es regulada por el ácido salicílico (SA) ya que esta es iniciada por un estallido oxidativo que induce la producción de SA activando genes como *ICS1*, y SA facilita la translocación del regulador *NPR1* al núcleo, donde este activa la expresión de genes de defensa, incluido *PR1* que actúa a su vez como un marcador inmunitario cuya expresión es inducida tanto por SA como por melatonina, participando activamente en la respuesta de defensa contra patógenos. Este proceso crea un ciclo de

retroalimentación positiva: la melatonina induce directamente *PR1*, lo que a su vez aumenta la producción de SA y refuerza la respuesta inmune de la planta (Lee et al., 2015). Este modelo se ajusta con los datos obtenidos ya que como en el modelo se postula ambos *PR1* y *S5H* que participara en la síntesis de SA están inducidos, los resultados con el tratamiento de serotonina sería por tanto consecuencia de esta, activando el *feedback* positivo antes descrito de la melatonina.

4.4.2. Análisis de los niveles de acumulación de los ácidos salicílico y gentísico tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina en plantas de tomate

La inducción de *PR1* y *S5H*, genes implicados en la respuesta defensiva de la planta, invitan a evaluar los contenidos en SA y GA de las plantas tratadas con serotonina y melatonina para observar si existen diferencias asociadas al efecto de los tratamientos (Figura 12). El SA es crucial en la respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos bióticos, como bacterias e insectos chupadores. Ante este tipo de estrés, los niveles de SA aumentan, desencadenando la muerte celular en el área infectada, lo que frena la expansión del patógeno (Song et al., 2023). Este proceso, llamado reacción hipersensible, activa el sistema defensivo completo de la planta y proporciona una "memoria defensiva". El factor *NPR1* regula positivamente esta respuesta, acumulando proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), como *PR1* (Lee et al., 2015). El ácido gentísico (GA) es un metabolito derivado del ácido salicílico (SA) que se acumula en plantas frente a patógenos de RNA. Se ha observado que tanto SA como GA promueven la activación de genes relacionados con el silenciamiento de RNA, resultando en una resistencia efectiva a infecciones por virus como ToMV y viroides como CEVd en tomate y otras plantas (Campos et al., 2014). GA actúa como una señal adicional a SA para activar defensas inducibles y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Bellés et al., 1999).

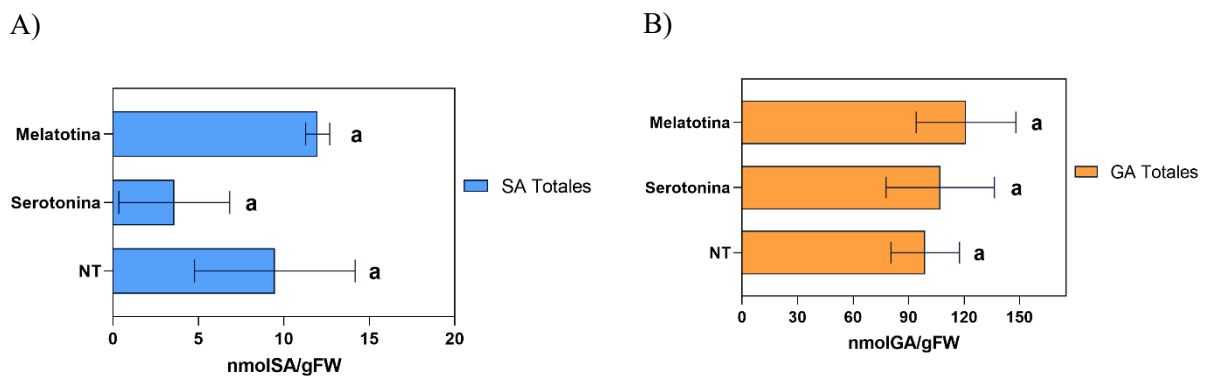


Figura 12. Cuantificación de (A) ácido salicílico (SA) y (B) ácido gentísico (GA) en plantas Money Maker sin tratar (NT), tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina) Los datos se obtuvieron de tres plantas independientes y se expresan como promedio \pm DE de las tres replicas técnicas de un experimento representativo. Se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher, diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Los resultados de la Figura 12 indican que no se observan diferencias significativas en los contenidos de SA ni de GA tras 24 horas de ambos tratamientos sugiriendo que su papel en la defensa podría ser independiente de SA. Alternativamente, la acumulación podría tener lugar a tiempos distintos a los analizados, pues se observa cierta tendencia en la acumulación de GA, aunque no resulte significativa.

4.5. Estudio de la resistencia de plantas de tomate tras tratamientos exógenos con serotonina y melatonina

Tras los resultados anteriores en los cuales se ha determinado que el gen *TDC2* asociado a la serotonina aumenta su expresión en condiciones de infección bacteriana y que tratamientos exógenos inducen la expresión de genes involucrados en la respuesta defensiva, aunque de forma independiente al SA, se quiso comprobar la eficacia defensiva tanto de la serotonina como de la melatonina en plantas de tomate frente a *Pst*. Para ello se infectaron plantas previamente tratadas con ambos compuestos individualmente y se evaluó la resistencia a una infección bacteriana causada por la bacteria mediante un conteo bacteriano (Figura 13).

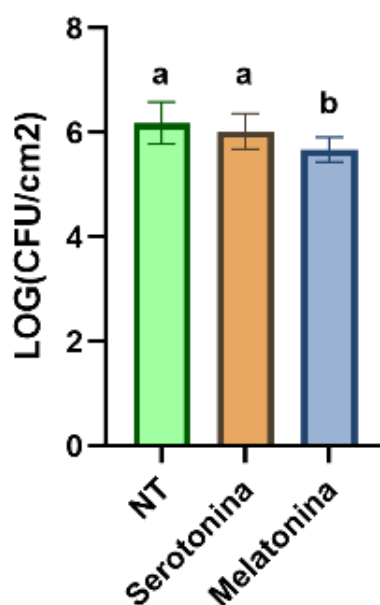


Figura 13 Crecimiento de *Pst* en hojas de plantas Money Maker sin tratamiento, (NT) tratadas con Serotonina 100 mM (Serotonina) o con Melatonina 100 mM (Melatonina) el día previo a la infección bacteriana. Las muestras fueron tomadas 24h tras realizar la infección con *Pst*. Los datos se expresan como promedio \pm DE de cuatro plantas independientes de un experimento representativo. Los datos se analizaron utilizando One Way Anova y comparaciones por el método Fisher, diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

El efecto del tratamiento de melatonina mostró una disminución significativa de la carga bacteriana, sin embargo, la serotonina no manifestó capacidad suficiente para activar las defensas y que la planta pudiera hacer frente a la infección bajo las condiciones experimentales utilizadas. Estudios previos han demostrado la importancia de la melatonina en la respuesta a estrés biótico (Lee et al., 2015) activando la maquinaria defensiva de la planta de manera significativa, lo que se traduce en una respuesta más efectiva frente a la infección. Por otra parte, investigaciones han revelado el papel esencial

de la melatonina en mandioca (*Manihot esculenta*) frente a una infección bacteriana a través de la señalización de etileno (Wei et al., 2022). Estos resultados son compatibles con los obtenidos en el presente trabajo (Figura 12) que sugieren que la activación de la respuesta defensiva de la serotonina y melatonina no está mediada por SA. Para confirmarlo, sería muy interesante evaluar la resistencia de las plantas NahG, incapaces de acumular SA, tras tratamientos exógenos con estas moléculas.

4.6. Perspectivas futuras

La observación de raíces estadísticamente más largas en plantas de la línea *RNAi_TWI* es de gran interés ya que proporcionan una absorción más eficiente de agua y nutrientes, mejorando la tolerancia a la sequía y a los vientos fuertes, y asegurando una mayor estabilidad de la planta. Además, conlleva a un crecimiento más vigoroso, mayor producción de frutos de alta calidad y un uso óptimo de los fertilizantes (Villordon et al., 2014). El hecho de que los flavonoides participan en el crecimiento de la raíz principal amplía el campo de estudio para generar líneas vegetales con las raíces más largas que maximicen el rendimiento y la calidad del cultivo de tomate. Por ello se considera la realización de estudios de vigor y tamaño del fruto, para ver si se corresponde que las raíces sean más grandes con una mayor calidad en el fruto de tomate. Además, se propone profundizar en el análisis del contenido de flavonoides en raíz para regular su longitud con el fin de la mejora del cultivo e incrementar su rendimiento agronómico. Del mismo modo, el estudio de la acumulación de los sustratos y productos de *Twil* en semillas transgénicas *RNAi_t* y control, sometidas o no a condiciones de envejecimiento acelerado, sería de gran interés para confirmar el papel de esta glicosiltransferasa en la longevidad de las semillas de tomate.

Otro punto de interés es analizar con más detalle la causa de la represión del gen *TDC2* durante la infección viroidal. Para determinar si esta represión se debe a la acción del viroide o al mecanismo defensivo de la planta, se plantea un análisis de su expresión en plantas tratadas con elicitores que simulan una infección viroidal. Este enfoque permitirá comprender mejor la respuesta defensiva de la planta frente a estos patógenos y los mecanismos que utilizan durante la infección para evadir los mecanismos defensivos.

Por último, se pretende optimizar los tratamientos con melatonina para mejorar su efecto defensivo. Se considera experimentar con tratamientos repetidos de melatonina, ya que las aplicaciones periódicas pueden activar y mantener mejor la maquinaria defensiva de la planta, superar la resistencia inicial, mejorar la absorción y acumular efectos positivos, asegurando así una respuesta más robusta y sostenida. Además, se busca probar el efecto de los tratamientos frente a otros patógenos y plantas bajo estrés abiótico para evaluar la efectividad del tratamiento midiendo parámetros fisiológicos como crecimiento, biomasa y fotosíntesis, además de marcadores bioquímicos como prolina, ROS y actividad antioxidante. La obtención de un tratamiento efectivo puede ser la base del desarrollo de herramientas en agricultura para el control de enfermedades y paliar situaciones de estrés abiótico.

5. CONCLUSIONES

- Las plantas transgénicas *35S: THT*, con mayor contenido constitutivo de HCAAs, presentan una raíz principal más corta y menos raíces laterales, debido al mayor gasto energético en el refuerzo de la pared celular, lo que las hace menos eficientes en el crecimiento bajo condiciones normales.
- Las plantas transgénicas *RNAi_TWI*, con niveles alterados de los flavonoides tras una infección, muestran una mayor longitud de la raíz principal, sin afectar significativamente la cantidad de raíces laterales. Estos resultados destacan la importancia de los flavonoides como reguladores positivos del crecimiento de raíces en tomate y revelan una nueva función para *Twil*.
- La expresión del gen *TDC2* aumenta estadísticamente en condiciones de estrés térmico y daño mecánico, confirmando la implicación de la serotonina en la adaptación y protección de las plantas.
- La expresión del gen *TDC2* se ve incrementado significativamente en plantas de tomate infectadas con bacterias, especialmente con la cepa virulenta, sugiriendo un papel crucial de la serotonina en la defensa biótica contra patógenos bacterianos.
- La infección por viroide reprime significativamente la expresión de *TDC2*, posiblemente debido a la manipulación de las rutas de señalización de defensa de la planta y el metabolismo del triptófano por parte del CEVd, lo que sugiere estrategias de evasión de este patógeno.
- Los tratamientos exógenos con serotonina y melatonina inducen significativamente la expresión de los genes *TDC2* y *SNAT*, sugiriendo una regulación por retroalimentación positiva en su producción.
- Los tratamientos exógenos con serotonina y melatonina incrementan la expresión de los genes *THT* y *POD*, sugiriendo que su papel defensivo en la planta podría ser a través de su actividad como antioxidante, mediada por las HCAAs y peroxidasas.
- Los tratamientos con serotonina y melatonina inducen significativamente la expresión del gen *PR1*, marcador clave de la respuesta sistémica adquirida (SAR) y del gen *S5H*, implicado en la síntesis del GA a pesar de que la acumulación de ambos compuestos fenólicos permanece constante.
- El tratamiento con melatonina muestra una reducción significativa de la carga bacteriana 24 horas después de la infección, sugiriendo su papel defensivo en plantas de tomate.

6. BIBLIOGRAFIA

- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(2), 93–107. <https://doi.org/10.1079/ssr2004159>
- Bajwa, V. S., Shukla, M. R., Sherif, S. M., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (2015). Identification and characterization of serotonin as an anti-browning compound of apple and pear. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.018>
- Bednarek, P., Schneider, B., Svatoš, A., Oldham, N. J., & Hahlbrock, K. (2005). Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology*, 138(2), 1058-1070. <https://doi.org/10.1104/pp.104.057794>
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., & Conejero, V. (1999). Gentisic Acid As a Pathogen-Inducible Signal, Additional to Salicylic Acid for Activation of Plant Defenses in Tomato (Vol. 12, Número 3).
- Bonneau, L., Carre, M., & Martin-Tanguy, J. (1994). Polyamines and related enzymes in rice seeds differing in germination potential. <https://doi.org/10.1007/BF00024679>
- Buschmann, H., Rodriguez, M. X., Tohme, J., & Beeching, J. R. (2000). Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Annals of Botany*, 86(6), 1153-1160. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1285>
- Byeon, Y., Lee, H. Y., Lee, K., & Back, K. (2014). Caffeic acid O-methyltransferase is involved in the synthesis of melatonin by methylating N-acetylserotonin in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, 57(2), 219-227. <https://doi.org/10.1111/jpi.12160>
- Campos, L., Granell, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Conejero, V., Bellés, J. M., Rodrigo, I., & Lisón, P. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 77, 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.016>
- 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 Twil plays a role in flavonoid glycosylation and defence against virus. *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2063-9>

- Chi, W. C., Chen, Y. A., Hsiung, Y. C., Fu, S. F., Chou, C. H., Trinh, N. N., Chen, Y. C., & Huang, H. J. (2013). Autotoxicity mechanism of *Oryza sativa*: Transcriptome response in rice roots exposed to ferulic acid. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-351>
- Commisso, M., Negri, S., Gecchele, E., Fazon, E., Pontoriero, C., Avesani, L., & Guzzo, F. (2022). Indolamine accumulation and TDC/T5H expression profiles reveal the complex and dynamic regulation of serotonin biosynthesis in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.975434>
- Cutillo, F., D'Abrosca, B., DellaGreca, M., Di Marino, C., Golino, A., Previtiera, L., & Zarrelli, A. (2003). Cinnamic acid amides from *Chenopodium album*: Effects on seeds germination and plant growth. *Phytochemistry*, 64(8), 1381-1387. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00511-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00511-9)
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., & Koornneef, M. (2000). Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in *Arabidopsis* l. www.plantphysiol.org
- Dharmawardhana, P., Ren, L., Amarasinghe, V., Monaco, M., Thomason, J., Ravenscroft, D., McCouch, S., Ware, D., & Jaiswal, P. (2013). A genome scale metabolic network for rice and accompanying analysis of tryptophan, auxin and serotonin biosynthesis regulation under biotic stress. *Rice*, 6(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-15>
- Egelund, J., Skjöt, M., Geshi, N., Ulvskov, P., & Petersen, B. L. (2004). A complementary bioinformatics approach to identify potential plant cell wall glycosyltransferase-encoding genes. *Plant Physiology*, 136(1), 2609-2620. <https://doi.org/10.1104/pp.104.042978>
- Erland, L. A. E., Turi, C. E., & Saxena, P. K. (2016). Serotonin: An ancient molecule and an important regulator of plant processes. En *Biotechnology Advances* (Vol. 34, Número 8, pp. 1347-1361). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.002>
- *EPlant*. (2023). Recuperado 20 de noviembre de 2023, de https://bar.utoronto.ca/eplant_tomato
- FAOSTAT. Fao.org. Recuperado el 7 de junio de 2024, de <https://www.fao.org/faostat/es/>
- Franco, D. M., Silva, E. M., Saldanha, L. L., Adachi, S. A., Schley, T. R., Rodrigues, T. M., Dokkedal, A. L., Nogueira, F. T. S., & Rolim de Almeida, L. F. (2015). Flavonoids modify root growth and modulate expression of SHORT-ROOT and HD-ZIP III. *Journal of Plant Physiology*, 188, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.009>
- Fuertes, D. 2017. Caracterización de la glicosiltransferasa de tomate *Twil* y su papel en defensa frente a una infección viral. Trabajo Final de Máster. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universitat Politècnica de València-CSIC.

- Grech, C. 2023. Papel del salicilato de metilo en la comunicación entre plantas de tomate activada por patógenos. Trabajo Final de Máster. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. Universitat Politècnica de València-CSIC.
- Gülçin, İ. (2008). Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(6), 871-876. <https://doi.org/10.1080/14756360701626223>
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2005). Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves. *Planta*, 221(6), 904-914. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1484-x>
- Hardeland, R. (2016). Melatonin in plants – Diversity of levels and multiplicity of functions. *Frontiers in Plant Science*, 7(FEB2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00198>
- Hayashi, K., Fujita, Y., Ashizawa, T., Suzuki, F., Nagamura, Y., & Hayano-Saito, Y. (2016). Serotonin attenuates biotic stress and leads to lesion browning caused by a hypersensitive response to *Magnaporthe oryzae* penetration in rice. *Plant Journal*, 85(1), 46-56. <https://doi.org/10.1111/tpj.13083>
- Hayat, F., Sun, Z., Ni, Z., Iqbal, S., Xu, W., Gao, Z., Qiao, Y., Tufail, M. A., Jahan, M. S., Khan, U., Wan, C., & Gu, X. (2022). Exogenous Melatonin Improves Cold Tolerance of Strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) through Modulation of DREB/CBF-COR Pathway and Antioxidant Defense System. *Horticulturae*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030194>
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*-a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. En *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 64, Número 3). <https://journals.asm.org/journal/membr>
- Hoffmann, J., Berni, R., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2020). A review on the beneficial role of silicon against salinity in non-accumulator crops: Tomato as a model. En *Biomolecules* (Vol. 10, Número 9, pp. 1-15). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10091284>
- Hotta, Y., Nagatsu, A., Liu, W. et al. Efectos protectores de los derivados antioxidantes de la serotonina aislados del cártamo contra la disfunción miocárdica postisquémica. *Mol Cell Biochem* 238 , 151–162 (2002). <https://doi.org/10.1023/A:1019992124986>
- Huang, X., Li, W., & Zhang, X. (2021). Flavonoid scutellarin positively regulates root length through NUTCRAKER. *Plant Diversity*, 43(3), 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2020.08.001>

- Jaap G, Groot, SPC, Kraak, HL, Bergervoet, JHW y Bino, RJ (1996). Efectos de los tratamientos de hidratación previos al almacenamiento en el rendimiento de la germinación, el contenido de humedad, la síntesis de ADN y la tolerancia al deterioro controlado de las semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Seed Science Research* , 6 (2), 57–63. doi:10.1017/S0960258500003032 <https://doi.org/10.1017/S0960258500003032>
- Jafarbeigi, F., Samih, M. A., Alaei, H., & Shirani, H. (2020). Induced Tomato Resistance Against *Bemisia tabaci* Triggered by Salicylic Acid, β -Aminobutyric Acid, and Trichoderma. *Neotropical Entomology*, 49(3), 456-467. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00771-0>
- Joubert, M., van den Berg, N., Theron, J., & Swart, V. (2022). Transcriptomics Advancement in the Complex Response of Plants to Viroid Infection. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Número 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23147677>
- Kai, K., Shimizu, B. I., Mizutani, M., Watanabe, K., & Sakata, K. (2006). Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 67(4), 379-386. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.11.006>
- Kang, K., Kim, Y. S., Park, S., & Back, K. (2009). Senescence-induced serotonin biosynthesis and its role in delaying senescence in rice leaves. *Plant Physiology*, 150(3), 1380-1393. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138552>
- Kang, S., Kang, K., Lee, K., & Back, K. (2007). Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Reports*, 26(11), 2009-2015. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0405-9>
- Katagiri, F., Thilmony, R., & He, S. Y. (2002). The *Arabidopsis Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction. *The Arabidopsis Book*, 1, e0039. <https://doi.org/10.1199/tab.0039>
- Kaur, H., Bhardwaj, R. D., & Grewal, S. K. (2017). Mitigation of salinity-induced oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings by exogenous application of phenolic acids. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(10). <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2521-7>
- Kaur, H., Mukherjee, S., Baluska, F., & Bhatla, S. C. (2015). Regulatory roles of serotonin and melatonin in abiotic stress tolerance in plants. En *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 10, Número 11). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1049788>
- Khawula, S., Gokul, A., Niekerk, L. A., Basson, G., Keyster, M., Badiwe, M., Klein, A., & Nkomo, M. (2024a). Insights into the Effects of Hydroxycinnamic Acid and Its Secondary Metabolites as Antioxidants for Oxidative Stress and Plant Growth under Environmental Stresses. En *Current Issues in Molecular Biology* (Vol. 46, Número 1, pp. 81-95). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cimb46010007>
- Khawula, S., Gokul, A., Niekerk, L. A., Basson, G., Keyster, M., Badiwe, M., Klein, A., & Nkomo, M. (2024b). Insights into the Effects of Hydroxycinnamic Acid and Its

Secondary Metabolites as Antioxidants for Oxidative Stress and Plant Growth under Environmental Stresses. En *Current Issues in Molecular Biology* (Vol. 46, Número 1, pp. 81-95). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cimb46010007>

- Kuhn, B. M., Geisler, M., Bigler, L., & Ringli, C. (2011). Flavonols accumulate asymmetrically and affect auxin transport in arabidopsis. *Plant Physiology*, 156(2), 585-595. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175976>
- Kumar, G., Saad, K. R., Arya, M., Puthusseri, B., Mahadevappa, P., Shetty, N. P., & Giridhar, P. (2021). The Synergistic role of serotonin and melatonin during temperature stress in promoting cell division, ethylene and isoflavones biosynthesis in *Glycine max*. *Current Plant Biology*, 26, 100206. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100206>
- Lee, H. Y., Byeon, Y., & Back, K. (2014). Melatonin as a signal molecule triggering defense responses against pathogen attack in *Arabidopsis* and tobacco. *Journal of Pineal Research*, 57(3), 262-268. <https://doi.org/10.1111/jpi.12165>
- Lee, H. Y., Byeon, Y., Tan, D. X., Reiter, R. J., & Back, K. (2015). *Arabidopsis* serotonin N-acetyltransferase knockout mutant plants exhibit decreased melatonin and salicylic acid levels resulting in susceptibility to an avirulent pathogen. *Journal of Pineal Research*, 58(3), 291-299. <https://doi.org/10.1111/jpi.12214>
- Lewis, D. R., Ramirez, M. V., Miller, N. D., Vallabhaneni, P., Keith Ray, W., Helm, R. F., Winkel, B. S. J., & Muday, G. K. (2011). Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiology*, 156(1), 144-164. <https://doi.org/10.1104/pp.111.172502>
- Li, J., Meng, Y., Zhang, K., Li, Q., Li, S., Xu, B., Georgiev, M. I., & Zhou, M. (2021). Jasmonic acid-responsive RRTF1 transcription factor controls DTX18 gene expression in hydroxycinnamic acid amide secretion. *Plant Physiology*, 185(2), 369-384. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA043>
- 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>
- Liu, G., Hu, Q., Zhang, X., Jiang, J., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2022). Melatonin biosynthesis and signal transduction in plants in response to environmental conditions. En *Journal of Experimental Botany* (Vol. 73, Número 17, pp. 5818-5827). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac196>
- 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. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.922119>

- López-Gresa MP, Conejero V, Lisón P, Rodrigo I, Bellés JM (2011). Compound with antioxidant activity. PCT/ES2011/070269
- López-Gresa, M. P., Lisón, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I., & Bellés, J. M. (2016). Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166938>
- López-Gresa, M. P., Maltese, F., Bellés, J. M., Conejero, V., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochemical Analysis*, 21(1), 89-94. <https://doi.org/10.1002/pca.1179>
- López-Gresa, M. P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., & Conejero, V. (2011). Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environmental and Experimental Botany*, 74(1), 216-228. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.06.003>
- Luo, Y., Hu, T., Huo, Y., Wang, L., Zhang, L., & Yan, R. (2023). Effects of Exogenous Melatonin on *Chrysanthemum* Physiological Characteristics and Photosynthesis under Drought Stress. *Horticulturae*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010106>
- Ly, D., Kang, K., Choi, J. Y., Ishihara, A., Back, K., & Lee, S. G. (2008). HPLC analysis of serotonin, tryptamine, tyramine, and the hydroxycinnamic acid amides of serotonin and tyramine in food vegetables. *Journal of Medicinal Food*, 11(2), 385-389. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.514>
- 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>
- Macoy, D. M., Kim, W. Y., Lee, S. Y., & Kim, M. G. (2015). Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. En *Plant Biotechnology Reports* (Vol. 9, Número 5, pp. 269-278). Springer-Verlag Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s11816-015-0368-1>
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. En *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 5, Número 4, pp. 359-368). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Mascellani Bergo, A., Leiss, K., & Havlik, J. (2024). Twenty Years of 1H NMR Plant Metabolomics: A Way Forward toward Assessment of Plant Metabolites for Constitutive and Inducible Defenses to Biotic Stress. En *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 72, Número 15, pp. 8332-8346). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c09362>
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., & He, S. Y. (2017). Stomatal defense a decade later. En *Plant Physiology* (Vol. 174, Número 2, pp. 561-571). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01853>

- Mizoi, J., Todaka, D., Imatomi, T., Kidokoro, S., Sakurai, T., Kodaira, K. S., Takayama, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2023). The ability to induce heat shock transcription factor-regulated genes in response to lethal heat stress is associated with thermotolerance in tomato cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1269964>
- Mo, Y., Nagelt, C., & Taylor, L. P. (1992). Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen (pollen germination/pollen tube/maize/petunia). En *Plant Biology* (Vol. 89). <https://www.pnas.org>
- Mukherjee, S., David, A., Yadav, S., Baluška, F., & Bhatla, S. C. (2014). Salt stress-induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiologia Plantarum*, 152(4), 714-728. <https://doi.org/10.1111/ppl.12218>
- Negri, S., Commisso, M., Avesani, L., & Guzzo, F. (2021). The case of tryptamine and serotonin in plants: A mysterious precursor for an illustrious metabolite. En *Journal of Experimental Botany* (Vol. 72, Número 15, pp. 5336-5355). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab220>
- Niñoles, R., Arjona, P., Azad, S. M., Hashim, A., Casañ, J., Bueso, E., Serrano, R., Espinosa, A., Molina, I., & Gadea, J. (2023a). Kaempferol-3-rhamnoside overaccumulation in flavonoid 3'-hydroxylase tt7 mutants compromises seed coat outer integument differentiation and seed longevity. *New Phytologist*, 238(4), 1461-1478. <https://doi.org/10.1111/nph.18836>
- Niñoles, R., Arjona, P., Azad, S. M., Hashim, A., Casañ, J., Bueso, E., Serrano, R., Espinosa, A., Molina, I., & Gadea, J. (2023b). Kaempferol-3-rhamnoside overaccumulation in flavonoid 3'-hydroxylase tt7 mutants compromises seed coat outer integument differentiation and seed longevity. *New Phytologist*, 238(4), 1461-1478. <https://doi.org/10.1111/nph.18836>
- Paquette, S., Lindberg Møller, B., & Bak, S. (2003). On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. www.elsevier.com/locate/phytochem
- Payá, C., Minguillón, S., Hernández, M., Miguel, S. M., Campos, L., Rodrigo, I., Bellés, J. M., López-Gresa, M. P., & Lisón, P. (2022). SLS5H silencing reveals specific pathogen-triggered salicylic acid metabolism in tomato. *BMC Plant Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03939-5>
- Prol, F. V., Márquez-Molins, J., Rodrigo, I., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Gómez, G., Pallás, V., & Lisón, P. (2021). Symptom severity, infection progression and plant responses in solanum plants caused by three pospiviroids vary with the inoculation procedure. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126189>
- Qi, Y. H., Kawano, N., Yamauchi, Y., Ling, J. Q., Li, D. B., & Tanaka, K. (2005). Identification and cloning of a submergence-induced gene OsGGT (glycogenin

- glucosyltransferase) from rice (*Oryza sativa* L.) by suppression subtractive hybridization. *Planta*, 221(3), 437-445. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1453-9>
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., & Job, D. (2012). Seed germination and vigor. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 63, pp. 507–533). <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105550>
 - Ramarosan, M. L., Koutouan, C., Helesbeux, J. J., Le Clerc, V., Hamama, L., Geoffriau, E., & Briard, M. (2022). Role of Phenylpropanoids and Flavonoids in Plant Resistance to Pests and Diseases. En *Molecules* (Vol. 27, Número 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27238371>
 - Ramtekey, V., Cherukuri, S., Kumar, S., V, S. K., Sheoran, S., K, U. B., K, B. N., Kumar, S., Singh, A. N., & Singh, H. V. (2022). Seed Longevity in Legumes: Deeper Insights Into Mechanisms and Molecular Perspectives. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.918206>
 - Rao, P. J. M., Pallavi, M., Bharathi, Y., Priya, P. B., Sujatha, P., & Prabhavathi, K. (2023). Insights into mechanisms of seed longevity in soybean: a review. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1206318>
 - Ren, L., Huo, H., Zhang, F., Hao, W., Xiao, L., Dong, C., & Xu, G. (2016). The components of rice and watermelon root exudates and their effects on pathogenic fungus and watermelon defense. *Plant Signaling and Behavior*, 11(6). <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1187357>
 - Roşca, M., Mihalache, G., & Stoleru, V. (2023). Tomato responses to salinity stress: From morphological traits to genetic changes. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1118383>
 - Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic Acquired Resistance. En *The Plant Cell* (Vol. 8). American Society of Plant Physiologists. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1809>
 - Sanzón Gómez, D., & Mejía, E. Z. (2011). Hypersensitive Reaction, a Programmed Cell Death to Defend from Attack by Plant Pathogens.
 - Sharif, R., Xie, C., Zhang, H., Arnao, M. B., Ali, M., Ali, Q., Muhammad, I., Shalmani, A., Nawaz, M. A., Chen, P., & Li, Y. (2018). Melatonin and its effects on plant systems. En *Molecules* (Vol. 23, Número 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23092352>
 - Song, W., Shao, H., Zheng, A., Zhao, L., & Xu, Y. (2023). Advances in Roles of Salicylic Acid in Plant Tolerance Responses to Biotic and Abiotic Stresses. <https://doi.org/10.3390/plants>
 - Tarengi, E., & Martin-Tanguy, J. (1995). Polyamines, floral induction and floral development of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). En *Plant Growth Regulation* (Vol. 17). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1023/A:1013343106574>

- Thirumalaikumar, V. P., Devkar, V., Mehterov, N., Ali, S., Ozgur, R., Turkan, I., Mueller-Roeber, B., & Balazadeh, S. (2018). NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 enhances drought tolerance in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2), 354-366. <https://doi.org/10.1111/pbi.12776>
- Tsunoda, Y., Hano, S., Imoto, N., Shibuya, T., Ikeda, H., Amagaya, K., Kato, K., Shirakawa, H., Aso, H., & Kanayama, Y. (2021). Physiological roles of tryptophan decarboxylase revealed by overexpression of SITDC1 in tomato. *Scientia Horticulturae*, 275. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109672>
- Van De Staaij, J., De Bakker, N. V. J., Oosthoek, A., Broekman, R., Van Beem, A., Stroetenga, M., Aerts, R., & Rozema, J. (2002). Flavonoid concentrations in three grass species and a sedge grown in the field and under controlled environment conditions in response to enhanced UV-B radiation. *En Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (Vol. 66). www.elsevier.com/locate/jphotobiol
- Villordon, A. Q., Ginzberg, I., & Firon, N. (2014). Root architecture and root and tuber crop productivity. *En Trends in Plant Science* (Vol. 19, Número 7, pp. 419-425). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.002>
- Walters, D. R. (2003). Polyamines and plant disease. *En Phytochemistry* (Vol. 64, Número 1, pp. 97-107). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00329-7)
- Wang, R., Mao, C., Jiang, C., Zhang, L., Peng, S., Zhang, Y., Feng, S., & Ming, F. (2021). One Heat Shock Transcription Factor Confers High Thermal Tolerance in Clematis Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms22062900>
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *En Plant Signaling and Behavior* (Vol. 7, Número 10). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Wasson, A. P., Pellerone, F. I., & Mathesius, U. (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell*, 18(7), 1617-1629. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038232>
- Wei, Y., Zhu, B., Ma, G., Shao, X., Xie, H., Cheng, X., Zeng, H., & Shi, H. (2022). The coordination of melatonin and anti-bacterial activity by EIL5 underlies ethylene-induced disease resistance in cassava. *Plant Journal*, 111(3), 683-697. <https://doi.org/10.1111/tbj.15843>
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E., & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *En Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 36, Número 7, pp. 838-849). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001>
- Xiang, J., Zhang, M., Apea-Bah, F. B., & Beta, T. (2019). Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of

foxtail millet. Food Chemistry, 295, 214-223.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.058>

- Xu, Y., Zou, J., Zheng, H., Xu, M., Zong, X., & Wang, L. (2019). RNA-seq transcriptome analysis of rice primary roots reveals the role of flavonoids in regulating the rice primary root growth. *Genes*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/genes10030213>
- Yamaguchi, M., & Sharp, R. E. (2010). Complexity and coordination of root growth at low water potentials: Recent advances from transcriptomic and proteomic analyses. *Plant, Cell and Environment*, 33(4), 590–603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02064.x>
- Zacarés, L., Pilar López-Gresa, M., Fayos, J., Primo, J., Bellés, J. M., & Conejero, V. (2007). Induction of p-Coumaroyldopamine and Feruloyldopamine, Two Novel Metabolites, in Tomato by the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. / 1439 MPMI, 20(11), 1439-1448. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Zahra, N., Kausar, A., Abdelghani, H. T. M., Singh, S., Vashishth, D. S., Bachheti, A., Bachheti, R. K., & Husen, A. (2024). Serotonin improves plant growth, foliar functions and antioxidant defence system in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Br.). *South African Journal of Botany*, 170, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.05.002>
- Zeiss, D. R., Piater, L. A., & Dubery, I. A. (2021). Hydroxycinnamate Amides: Intriguing Conjugates of Plant Protective Metabolites. *En Trends in Plant Science* (Vol. 26, Número 2, pp. 184-195). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.011>
- Zhang, H. J., Zhang, N., Yang, R. C., Wang, L., Sun, Q. Q., Li, D. B., Cao, Y. Y., Weeda, S., Zhao, B., Ren, S., & Guo, Y. D. (2014). Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA4 interaction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Journal of Pineal Research*, 57(3), 269-279. <https://doi.org/10.1111/jpi.12167>
- Zhang, S., Ai, G., Li, M., Ye, Z., & Zhang, J. (2018). Tomato LrgB regulates heat tolerance and the assimilation and partitioning of carbon. *Plant Science*, 274, 309-319. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.06.001>
- Zhang, X., Huang, X., Li, Y., Tao, F., Zhao, Q., & Li, W. (2021). Polar auxin transport May Be responsive to specific features of flavonoid structure. *Phytochemistry*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112702>