



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# Trabajo Final de Máster

Caracterización de la glicosiltransferasa de tomate  
Twi1 y su papel en defensa frente a  
una infección viral

Autora

Diana Fuertes Bailón

Directores

Dra. Laura Campos Beneyto  
Dr. Ismael Rodrigo Bravo

Universitat Politècnica de València  
2017

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a todo mi grupo de investigación, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto final de máster y marcar ese antes y después en mi vida. No os podéis llegar a imaginar lo que he podido aprender con vosotros y las grandes experiencias que llevaré conmigo.

A José María Bellés porque siempre saca una sonrisa y anima cuando te ve trabajando en el laboratorio. A Vicente Conejero porque también te arranca una sonrisa, sobre todo en los almuerzos y en sus degustaciones de galletas.

Gracias a Mapi por ayudarme con el HPLC. Desde luego, sin ti y sin tu paciencia para desarrollar nuevos métodos de detección, este proyecto no hubiese sido posible. Gracias a Puri por todo el tiempo dedicado y por todas esas recomendaciones que han hecho posible responder todas esas dudas que han surgido a lo largo de todo este tiempo. Sois estupendas.

Tengo que dedicar un gracias muy muy especial a Laura, porque ha estado siempre allí ayudándome en todo. Muchas gracias por tu paciencia conmigo, por cada minuto dedicado y por explicarme siempre lo que no entendía. Sin toda tu dedicación, este proyecto no sería tan especial. También quiero agradecer a Ismael sus ratos frente al ordenador y todos sus consejos y ayuda para dejar este proyecto tan bonito y perfecto como se merece.

Mencionar también a todos los que he tenido la suerte de conocer: a Paula, Elías y a Marta, por ayudarnos en nuestros primeros pasos. A las nuevas adquisiciones: Celia y Samuel. Me alegro de haberos conocido a todos. A Teresa, a Susana y a Lorena, porque hacéis únicos los almuerzos. Gracias también a Nora, me ha encantado poder conocerte, ite deseo lo mejor porque te lo mereces!

Quiero agradecer de forma especial a Edu por todo lo que me ha ayudado. Ya sabes que formamos tan buen equipo que tenemos que hacer las cosas en nivel Maestro. ¡Pero lo logramos!

Gracias a Miguel, por ser un gran compañero. Espero que te vaya muy bien en esta nueva etapa.

Y por último agradecer también a mis padres, a mi novio y a mis amigos. Gracias por aguantarme todo este tiempo y por apoyarme y animarme hasta el último momento.

Muchas gracias a todos por esta gran experiencia.

## RESUMEN

Existe un conflicto continuo entre los organismos vegetales y patógenos de distinta naturaleza. Para hacer frente a estos ataques, las plantas presentan barreras físicas naturales y acumulan diversos compuestos defensivos. La respuesta defensiva suele estar acompañada de una rápida muerte celular en el sitio de infección y alrededores, formando parte de la respuesta hipersensible, que es el sistema de defensa más poderoso que tienen las plantas.

Los metabolitos secundarios de naturaleza fenólica juegan un papel muy importante en la respuesta defensiva. Entre todos ellos, podemos destacar las cumarinas, compuestos que se producen como mecanismo de defensa ante ataques patogénicos y estrés abiótico, proporcionando a las plantas herramientas antimicrobianas y antioxidantes. El presente Trabajo se centra en la escopoletina, una cumarina importante en *Arabidopsis* y descrita por primera vez en tomate. Su acumulación se ha correlacionado con la resistencia a diversos ataques, tanto bióticos como abióticos.

La mayoría de las cumarinas en plantas superiores existen como glicoconjugados. La glicosilación es una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios y se lleva a cabo mediante unas enzimas denominadas glicosiltransferasas. La glicosiltransferasa de tomate inducida por herida, *Twi1* (*Tomato Wound Induced 1*), tras ser purificada, mostró actividad *in vitro* frente a las cumarinas escopoletina, umbeliferona y esculetina. Para estudiar el papel de las cumarinas en la respuesta defensiva, se realizaron varios tratamientos exógenos en plantas con estos tres compuestos cumáricos en plantas de tomate 'Moneymaker' que silencian *Twi1*. A su vez, para observar si la aplicación exógena de escopoletina puede afectar a una infección patogénica, se infectaron con el virus del bronceado del tomate (TSWV) plantas transgénicas con silenciamiento de *Twi1*.

Tanto los tratamientos exógenos con distintas cumarinas, como la infección con TSWV de plantas transgénicas con niveles alterados de compuestos fenólicos, han resultado ser estrategias de gran utilidad en la realización de este Trabajo, permitiendo profundizar en el estudio de la glicosiltransferasa *Twi1* y en la función de la escopoletina en la respuesta defensiva de las plantas frente a ataques patogénicos.

## ABSTRACT

There is a continuous conflict between vegetal organisms and pathogens of different nature. To cope with these attacks, plants have natural physical barriers and accumulate various defensive compounds. This defensive response is usually accompanied by rapid cell death at the site of infection and surroundings, making part of the hypersensitive response, which is the most powerful defense system that plants have.

Secondary metabolites of phenolic nature play a very important role in the defensive response. Among them, we can highlight coumarins, compounds which are produced as a mechanism of defense against pathogenic attack and abiotic stress, providing the plants with antimicrobial and antioxidative weapons. The present Project focuses on scopoletin, an important coumarin in *Arabidopsis* and described in tomato for the first time. Its accumulation has been correlated with resistance to various attacks, both biotic and abiotic.

Most coumarins in higher plants exist as glycoconjugates. Glycosylation is one of the most common modifications of the secondary metabolites and it is carried out by enzymes called glycosyltransferases. The tomato wound induced glycosyltransferase *Tw1*, after being purified, showed *in vitro* activity against the coumarins scopoletin, umbelliferone and esculetin. To study the role of coumarins in the defensive response, several exogenous treatments were performed on plants with these three coumarins in 'MoneyMaker' tomato plants which silenced *Tw1*. On the other hand, to observe whether exogenous application of scopoletin may affect a pathogenic infection, *Tw1*-silenced transgenic plants were infected with Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV).

Both exogenous treatments with different coumarins and the TSWV infection of transgenic plants with altered levels of phenolic compounds have proven to be very useful strategies in the development of this work, allowing to deepen in the study of the glycosyltransferase *Tw1* and in the function of scopoletin in the defensive response of plants to pathogenic attacks.

## **PALABRAS CLAVE**

Patógeno, infección, resistencia, susceptibilidad, compuestos fenólicos, metabolitos secundarios, cumarina, escopoletina, purificación de proteínas, virus, actividad enzimática, plantas transgénicas, TSWV, silenciamiento.

<b>ÍNDICE GENERAL .....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. El sistema defensivo de las plantas.....	1
1.1. Interacción planta-patógeno.....	1
1.2. La respuesta defensiva de las plantas. La respuesta defensiva local y la respuesta defensiva sistémica .....	3
1.3. Señalización de la respuesta defensiva de las plantas. Interacciones entre las rutas de señalización.....	3
2. Los metabolitos secundarios en el sistema defensivo de las plantas.....	5
2.1. Metabolitos secundarios de naturaleza fenólica.....	5
2.2. Cumarinas.....	6
2.2.1. Escopoletina.....	9
2.2.2. Esculetina.....	10
2.2.3. Umbeliferona.....	10
3. Modificaciones de los metabolitos secundarios .....	11
3.1. La glicosilación en plantas e implicaciones fisiológicas de la glicosilación de metabolitos .....	11
3.2. La glicosilación en la respuesta defensiva.....	13
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	16
2. Tratamientos del material vegetal.....	17
2.1. Imbibición de las plantas en compuestos cumáricos .....	17
2.2. Inoculación de las plantas con el virus del bronceado del tomate (TSVW).....	17
2.2.1. Estudio de la sintomatología.....	18
3. Toma de muestras.....	19
4. Plásmidos y cepas bacterianas utilizados.....	19
5. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos.....	20
5.1. Extracción de RNA total en plantas.....	20

5.2. Reacciones de amplificación cuantitativa (qRT-PCR) .....	20
6. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos .....	21
6.1. Extracción de compuestos fenólicos .....	21
6.2. Cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC .....	22
7. Extracción y cuantificación de la actividad DPPH.....	22
7.1. Extracción de compuestos metabólicos.....	22
7.2. Cuantificación la actividad DPPH .....	22
8. Manipulación de proteínas.....	23
8.1. Purificación de la proteína <i>Twil</i> recombinante .....	23
8.2. Ensayo de actividad de la proteína <i>Twil</i> recombinante.....	24
8.3. Cuantificación por HPLC.....	25
8.4. Caracterización del tipo de enlace.....	25
9. Tratamiento estadístico de datos .....	25
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
1. Ensayo de actividad <i>in vitro</i> de la proteína recombinante <i>Twil</i> .....	27
1.1. Antecedentes .....	27
1.2. Análisis filogenético de <i>Twil</i> .....	27
1.3. Inoculación de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> con la construcción generada pGWB8_ <i>Twil</i> .....	28
1.4. Purificación de la proteína recombinante <i>Twil</i> .....	28
1.5. Ensayo de actividad de la proteína recombinante <i>Twil</i> .....	29
1.6. Ensayo de actividad de la proteína recombinante <i>Twil</i> , empleando escopoletina como sustrato aceptor del azúcar .....	30
1.7. Caracterización del tipo de enlace.....	31
2. Ensayo de actividad <i>in vivo</i> de la proteína recombinante <i>Twil</i> .....	32
2.1. Antecedentes .....	32
2.2. Tratamiento exógeno de plantas de tomate con los nuevos sustratos de <i>Twil</i> .....	33
3. Estudio del papel de la escopoletina en defensa .....	37
3.1. Antecedentes .....	37
3.2. Estudio de la acumulación de los genes de defensa PR1 y Tci21 por escopoletina .....	38
3.3. Tratamiento del inóculo con escopoletina.....	39
3.4. Sintomatología.....	40

4. Papel de <i>Tw1</i> : Inducción de <i>Tw1</i> en respuesta a la infección por virus <i>TSWV</i> en tomate .....	43
4.1. Análisis estadístico .....	44
4.2. Acumulación de escopoletina debido a la infección por TSWV .....	45
5. Fenotipo de las raíces de las plantas RNAi <i>Tw1</i> .....	49
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>53</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Modelo en 'zig-zag' ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas .....	2
<b>Figura 2</b> – Estructura química de una cumarina junto con su numeración IUPAC.....	6
<b>Figura 3</b> – Ruta de fenilpropanoides, que conduce a las rutas de síntesis de cumarinas.....	7
<b>Figura 4</b> – Principales tipos de cumarinas aisladas de plantas.....	8
<b>Figura 5</b> – Ruta de biosíntesis de cumarinas partiendo de glucosa .....	9
<b>Figura 6</b> – Secuencia consenso de las glicosiltransferasas de metabolitos secundarios.....	13
<b>Figura 7</b> – Imágenes de plantas infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) .....	19
<b>Figura 8</b> – Obtención del clon de expresión para Twi1 .....	20
<b>Figura 9</b> – Obtención del clon para el silenciamiento de Twi1 .....	20
<b>Figura 10</b> – Árbol filogenético de Twi1 con diferentes glicosiltransferasas ....	28
<b>Figura 11</b> – Purificación de Twi1 recombinante producida por expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> .....	29
<b>Figura 12</b> – Resultado frente al compuesto escopoletina usado como sustrato en la caracterización de la actividad in vitro de la proteína recombinante Twi1. ....	31
<b>Figura 13</b> – Perfiles de HPLC de escopoletina glicoconjugada con Twi1 antes de la hidrólisis, después de la hidrólisis con $\beta$ -glucosidasa y después de la hidrólisis con $\alpha$ -glucosidasa .....	32
<b>Figura 14</b> – Niveles de expresión del gen Twi1 en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 tratadas con escopoletina.....	33
<b>Figura 15</b> – Niveles de expresión del gen Twi1 en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 tratadas con umbeliferona.....	34
<b>Figura 16</b> – Niveles de expresión del gen Twi1 en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 tratadas con esculetina .....	34
<b>Figura 17</b> – Niveles de acumulación de escopoletina libre y total en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 .....	36
<b>Figura 18</b> – Niveles de acumulación de umbeliferona libre y total en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 .....	36

<b>Figura 19</b> – Niveles de expresión del gen PR1 en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 tratadas con escopoletina.....	38
<b>Figura 20</b> – Niveles de expresión del gen Tci21 en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 tratadas con escopoletina.....	39
<b>Figura 21</b> – Imágenes de plantas pertenecientes al ensayo del virus del bronceado del tomate (TSWV) .....	40
<b>Figura 22</b> – Porcentaje de plantas con síntomas en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) .....	41
<b>Figura 23</b> – Evolución del daño en folíolos de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) .....	42
<b>Figura 24</b> – Niveles de expresión del gen Twi1 en plantas de tomate 'Moneymaker' infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV).....	43
<b>Figura 25</b> – Niveles de acumulación de escopoletina total en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) .....	46
<b>Figura 26</b> – Medición del poder antioxidante de extractos de plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) tomadas a los 6 días después de la inoculación.....	47
<b>Figura 27</b> – Niveles de expresión del gen Tci21 en plantas de tomate 'Moneymaker' infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV).....	48
<b>Figura 28</b> – Niveles de expresión del gen Jaz9 en plantas de tomate 'Moneymaker' infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV).....	48
<b>Figura 29</b> – Niveles de expresión del gen Twi1 en raíces de plantas de tomate 'Moneymaker' y plantas transgénicas Twi1 .....	49
<b>Figura 30</b> – Longitud de raíces procedentes de plantas MoneyMaker y plantas transgénicas Twi1 medidas a los 5, 7 y 10 días después de la germinación ....	50
<b>Figura 31</b> – Comparación de la longitud de raíces procedentes de plantas MoneyMaker a modo de control y plantas transgénicas RNAi Twi1 de un mes de edad.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> – Escala de sintomatología. ....	18
<b>Tabla 2</b> – Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa .....	21
<b>Tabla 3</b> – Tabla de los diferentes compuestos usados como sustrato en la caracterización de la actividad in vitro de la proteína recombinante Twi1 .....	25
<b>Tabla 4</b> – Resultados cualitativos frente a diferentes compuestos usados como sustrato en la caracterización de la actividad in vitro de la proteína recombinante Twi1 .....	30
<b>Tabla 5</b> – Parámetros estadísticos del test de Kruskal-Wallis para los índices de sintomatología de plantas Moneymaker y plantas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 infectadas con TSWV .....	44
<b>Tabla 6</b> – Parámetros estadísticos del test de Mann-Whitney para la infectividad de plantas Moneymaker y plantas Twi1 1.1 (A), plantas control y plantas Twi1 28.3 (B) y plantas Twi1 1.1 y plantas Twi1 28.3 (C) infectadas con TSWV .....	45

## *Introducción*

# INTRODUCCIÓN

## 1. El sistema defensivo de las plantas

### 1.1. Interacción planta-patógeno

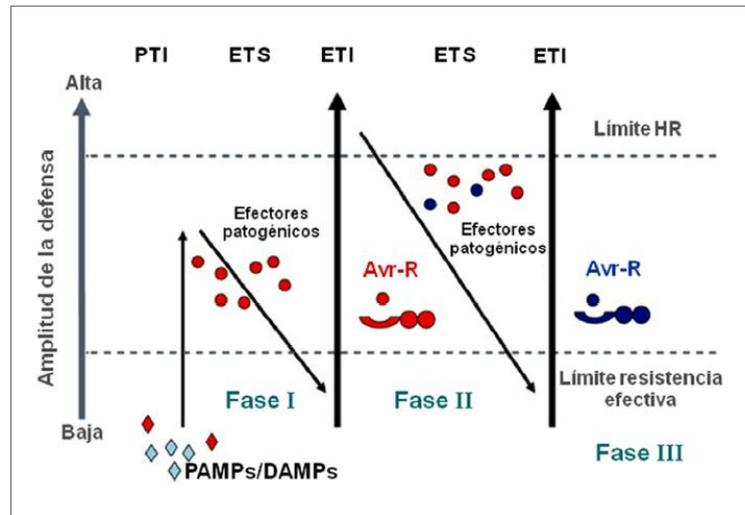
En cualquier hábitat natural, existe un conflicto continuo entre los microorganismos patógenos y los organismos multicelulares de mayor tamaño (Lam *et al.*, 2001). En el caso de las plantas, la protección pasiva contra patógenos que no están especializados en atacar a un huésped específico consiste en la presencia constitutiva de una serie de capas cuticulares de cera y una variedad de compuestos antimicrobianos. Estas defensas preexistentes suelen ser suficientes para contener el ataque de un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos, aunque pueden no ser efectivas para otros. En esta situación, la planta debe activar mecanismos defensivos más especializados.

La defensa de las plantas debe adaptarse para combatir dos tipos diferentes de patógenos. Los necrótrofos son patógenos que producen compuestos tóxicos y enzimas que dañan gravemente el tejido en el que se produce la invasión. Por el contrario, los biótropos se alimentan inicialmente de plantas de manera parásita, manteniendo vivas las células del tejido infectado durante una fracción significativa del ciclo de vida del patógeno; esto a veces va seguido, en los llamados *hemibiótrofos*, de una existencia más necrotrófica durante etapas posteriores de la infección (Walton, 1996; White *et al.*, 2000; Stuiver y Custers, 2001).

La respuesta defensiva se activa después del reconocimiento por las células vegetales de moléculas (*patrones*) asociadas al patógeno (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs) o mediante moléculas endógenas liberadas por la entrada de patógenos, conocidas como DAMPs (*Danger-Associated Molecular Patterns*) (Boller y Felix, 2009; Dodds y Rathjen, 2010; Newmann *et al.*, 2013; Jeandet *et al.*, 2013). Las primeras respuestas después de la inducción se caracterizan por procesos de señalización que incluyen flujos de iones, cascadas de proteína-quinasas MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Pitzschke *et al.*, 2009; Jeandet *et al.*, 2013) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (García-Brugger *et al.*, 2006; Jeandet *et al.*, 2013).

El reconocimiento entre planta y patógeno viene controlado por la interacción específica entre los productos de los genes que codifican los denominados *factores de avirulencia* (*Avr*) del patógeno y los productos de los genes de resistencia de la planta (*R*), en la llamada interacción *gen-a-gen* (Flor, 1971; Dangl y Jones, 2001). Dicha interacción resulta en el establecimiento en la planta de un nuevo nivel defensivo, denominado ETI (*Effector Triggered Immunity*). En otras ocasiones la ETI se activa debido al reconocimiento, por parte de las proteínas R, de la modificación de otra proteína de la planta, producida por el patógeno. La

proteína R actúa en este caso detectando la alteración de la proteína diana del efector patogénico y promoviendo la respuesta defensiva de la planta, lo que se conoce como *guard hypothesis* (Van der Biezen y Jones, 1998; Dangl y Jones, 2001; Jones y Dangl, 2006; van der Hoorn y Kamoun, 2008) (Figura 1).



**Figura 1** – Modelo en 'zig-zag' ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas. En la Fase I, la planta detecta los PAMPs/DAMPs (Pathogen-Associated Molecular patterns/Danger-Associated Molecular Patterns) mediante receptores de membrana PRRs (Pattern Recognition Receptors) inespecíficos, lo que establece mecanismos de defensa mediados por PAMPs (PTI, PAMP Triggered Immunity). En la Fase II, algunos efectores patogénicos pueden interferir con la PTI, estableciéndose una susceptibilidad ligada a dichos efectores (ETS, Effector-Triggered Susceptibility). En la Fase III, un determinado efector o factor de avirulencia (Avr) es reconocido específicamente por una proteína NB-LRR, activando la inmunidad ligada al efector (ETI, Effector-Triggered Immunity). Esto suele resultar en una respuesta hipersensible (HR), causando la muerte celular en el lugar de la infección (Adaptado de Jones y Dangl, 2006).

Cuando los correspondientes genes *R* y genes *Avr* están presentes tanto en el huésped como en el patógeno y se produce el reconocimiento específico *gen-a-gen*, el resultado es una interacción de tipo *incompatible*, dando lugar a la resistencia a la enfermedad. En este caso, se produce la muerte celular alrededor del punto de entrada, dando lugar a un rápido colapso del tejido infectado e impidiendo la posterior expansión del patógeno. Esta respuesta se conoce como "reacción hipersensible" (*Hypersensitive Reaction*, HR) y, en la mayoría de casos, va acompañada de la activación posterior de una resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) no específica, a lo largo de toda la planta (Ryals *et al.*, 1996; Beckers y Spoel, 2006; Kachroo y Robin, 2013). Si cualquiera de estos dos genes está inactivo o ausente, lleva consigo la falta de reconocimiento, lo que produce una interacción de tipo *compatible*, dando lugar al desarrollo de la enfermedad (Flor, 1971; Dangl y Jones, 2001). En este caso, se produce una infección de tipo sistémico y, al no producirse HR, no necrotizante.

## **1.2. La respuesta defensiva de las plantas. La respuesta defensiva local y la respuesta defensiva sistémica**

La respuesta de las plantas ante un intento de infección por patógenos microbianos suele estar acompañada de una rápida muerte celular en el sitio de infección y alrededores. Esta respuesta está asociada con la restricción del crecimiento del patógeno y representa una forma de muerte celular programada (*Programmed Cellular Death*, PCD) (Lam *et al.*, 2001). La PCD forma parte de la respuesta hipersensible y se clasifica según criterios morfológicos de las lesiones causadas por la muerte celular, así como según la supresión del crecimiento del patógeno (Morel y Dangl, 1997; Heath, 2000a; Heath, 2000b; Lam *et al.*, 2001). La respuesta hipersensible es el sistema de defensa más poderoso que tienen las plantas. Es una respuesta defensiva altamente organizada, tanto temporal como espacialmente, que involucra la producción de especies reactivas de oxígeno (la llamada "*explosión oxidativa*"), la muerte celular local, la elevada acumulación de compuestos fenólicos y los refuerzos de la pared celular en las células que rodean la zona de necrosis, y por último una inducción distal de la defensa inducida, la cual previene que se produzcan nuevas infecciones en las partes más distales de la planta (Dorey *et al.*, 1997; Costet *et al.*, 1999; Morel y Dangl, 1997; Melchers y Stuiver, 2000; Lam *et al.*, 2001; Stuiver y Custers, 2001).

Las proteín-quinatas se encuentran "*corriente arriba*" o independientes de la explosión oxidativa, y presuntamente dan lugar a la activación de factores de transcripción que están latentes y son requeridos para la activación de los genes de defensa (Dröge-Laser *et al.*, 1997; Dangl y Jones, 2001). Las funciones de estos genes de defensa incluyen la biosíntesis de ácido salicílico y de etileno, el fortalecimiento de la pared celular, la lignificación, la producción de compuestos antimicrobianos y la respuesta hipersensible (Scheel, 1998; Lam *et al.*, 2001; Dangl y Jones, 2001). Sin embargo, todavía no está claro cuáles de estos eventos son los mediadores de la acción de los genes *R*, y cuáles no lo son. Además de la resistencia local a la infección, este conjunto de eventos puede conducir también a la creación de resistencia sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) (Delaney, 1997; Dangl y Jones, 2001).

La SAR es una respuesta defensiva de larga duración, inducida por una infección localizada y que proporciona protección frente a un amplio espectro de patógenos (Grant y Lamb, 2006; Jeandet *et al.*, 2013). Se activa mediante una señal sistémica que prepara los tejidos distales frente a invasores similares (Amil-Ruiz *et al.*, 2016).

## **1.3. Señalización de la respuesta defensiva de las plantas. Interacciones entre las rutas de señalización**

Durante los últimos años, la identificación de los genes principales que actúan en la regulación de la defensa de las plantas ha puesto de manifiesto que las plantas utilizan varias rutas de defensa contra diferentes patógenos (Delaney *et al.*, 1994; Thomma *et al.*, 2001;

Pieterse y van Loon, 1999; Stuiver *et al.*, 2001). En general, estas rutas se caracterizan por emplear moléculas señal que son cruciales en la regulación de la expresión de las proteínas de defensa (Uknes *et al.*, 1992; Stuiver *et al.*, 2001). Compuestos como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) regulan las rutas de defensa de las plantas para desencadenar las respuestas apropiadas a los diferentes patógenos. Mientras que la ruta señalizada por SA se activa principalmente en respuesta a patógenos biótrofos, la ruta mediada por JA/ET se activa frente a patógenos necrótrofos. Estas dos rutas son, en general, antagónicas: la resistencia a biótrofos está a menudo correlacionada con una mayor susceptibilidad a patógenos necrótrofos, y una resistencia a necrótrofos está con frecuencia correlacionada con una mayor susceptibilidad a patógenos biótrofos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011; Amil-Ruiz *et al.*, 2016).

El equilibrio en la comunicación cruzada entre hormonas influye fuertemente en el resultado de las interacciones planta-patógeno, incluyendo el establecimiento de una inmunidad sistémica eficaz. El ácido giberélico (GA) provoca la degradación de las proteínas DELLA represoras del crecimiento, elevando la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y SA y atenuando la señalización de JA (Achard *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Aunque el JA es fundamental en la modulación de la defensa frente a patógenos necrótrofos, está a su vez implicado en otros aspectos de las interacciones planta-patógeno, incluyendo el establecimiento de la SAR (Truman *et al.*, 2006; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Las citoquininas (CK) promueven la resistencia frente a patógenos biótrofos mediante la mejora en la respuesta de SA por medio de *NPR1* (Choi *et al.*, 2010), gen que actúa como regulador de la señalización de SA en defensa. La activación de la señalización de auxinas desencadena la supresión de la biosíntesis de SA y su señalización (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Recíprocamente, tratamientos exógenos de SA desencadenan la estabilización de las proteínas AUX-IAA (ácido auxin/indol-3-acético) que regulan negativamente la señalización de auxinas (Wang *et al.*, 2007; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Por otra parte, la activación de la biosíntesis del ácido abscísico (ABA) y sus rutas de señalización promueve la susceptibilidad frente a una gran cantidad de patógenos (Asselbergh *et al.*, 2007; Ton y Mauch-Mani, 2004; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Todo indica, por tanto, que los patógenos están continuamente evolucionando para poder superar los mecanismos de defensa de las plantas, mediante la alteración de la compleja comunicación existente entre las diferentes rutas de defensa (Amil-Ruiz *et al.*, 2016).

## 2. Los metabolitos secundarios en el sistema defensivo de las plantas

Las plantas elaboran una amplia gama de productos naturales, muchos de los cuales han evolucionado para conferir una ventaja selectiva contra el ataque microbiano. Colectivamente, las plantas producen una diversa gama de más de 100.000 productos naturales de bajo peso molecular caracterizados hasta la fecha, también conocidos como metabolitos secundarios, que difieren de los componentes del metabolismo intermediario (o primario) en que generalmente no son esenciales para los procesos metabólicos básicos de la planta (Dixon, 2001).

Para gestionar tanto las interacciones positivas como negativas con el medioambiente y otras formas de vida, las diferentes especies de plantas sintetizan constantemente una mezcla compleja y cambiante de metabolitos secundarios que incluyen fenilpropanoides y sus derivados, así como terpenoides y alcaloides para responder a situaciones medioambientales específicas (Timell, 1986; Cheynier *et al.*, 2013; Mierziak *et al.*, 2014; Pusztahelyi *et al.*, 2015; Holbein *et al.*, 2016; Ishihara *et al.*, 2016; Le Roy *et al.*, 2016).

El presente Trabajo se centra en el estudio de compuestos de naturaleza fenólica y su papel en la interacción planta-patógeno. Por ello, esta familia de compuestos se trata en detalle en el siguiente apartado.

### 2.1. Metabolitos secundarios de naturaleza fenólica

Los compuestos fenólicos poseen uno o más anillos aromáticos con uno o varios grupos hidroxilo. Generalmente se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos (Spencer *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2015). Son productos del metabolismo secundario de las plantas, proporcionando funciones esenciales en la reproducción y el crecimiento de las mismas. También contribuyen en la coloración y actúan como mecanismo de defensa frente a patógenos, parásitos y depredadores (Bravo, 1998; Matos *et al.*, 2015).

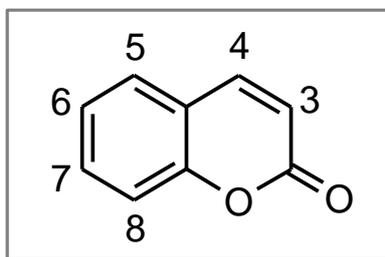
Las plantas sintetizan muchos tipos de compuestos fenólicos. Dependiendo de su esqueleto de carbono, estos compuestos se pueden dividir en cuatro grupos. El primer grupo se basa en los ácidos fenólicos, cuyo esqueleto de carbono es C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> e incluye el ácido gálico, el ácido salicílico y el ácido benzoico. El segundo grupo es el de los ácidos hidroxicinámicos (HCs, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), que incluye el ácido *p*-cumárico, el ácido cafeico y las cumarinas. El tercer grupo, el de los estilbenos, tiene un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> e incluye resveratrol, piceatanol y pallidol. El último grupo incluye los flavonoides, que presentan un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> e incluyen quercetina, genistéina y apigenina (Jaganath y Crozier, 2010; Yang *et al.*, 2015).

## 2.2. Cumarinas

Las cumarinas son un importante grupo de compuestos naturales que proporcionan a las plantas propiedades antimicrobianas y antioxidativas. Se producen como mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos y estrés abiótico (Borges *et al.*, 2005; Bourgaud *et al.*, 2006; Borges *et al.*, 2009; Siwinska *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015; Matos *et al.*, 2015). Derivan de la ruta de los fenilpropanoides (Figura 2), que es origen de una amplia variedad de metabolitos en plantas (Bourgaud *et al.*, 2006; Siwinska *et al.*, 2014).

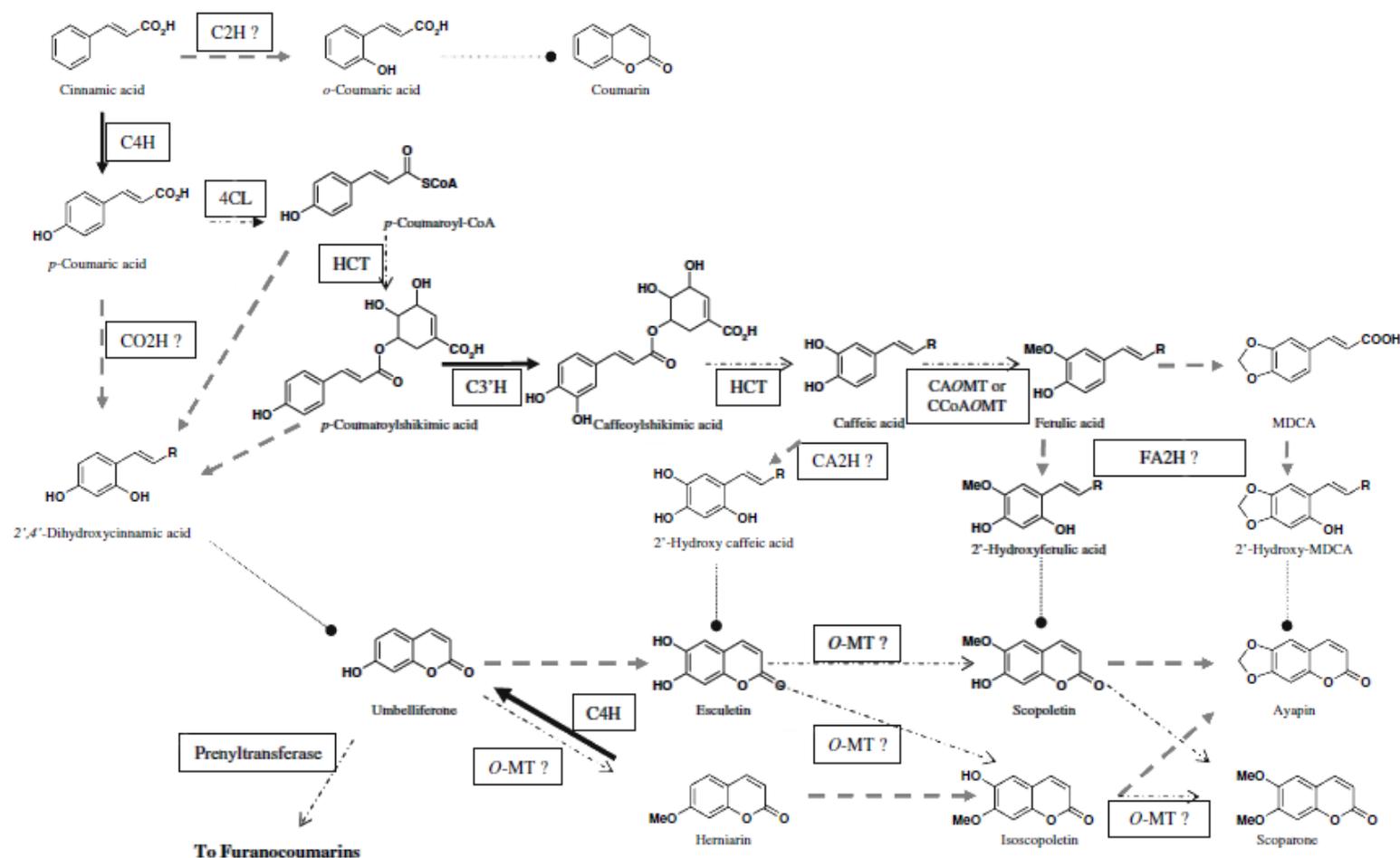
Se ha observado que las raíces acumulan mayores cantidades de cumarinas que los tallos. Se cree que esto puede ser debido a que las raíces están siempre expuestas a microorganismos y heridas físicas. Por ello, parece que necesitan una mayor protección que las partes aéreas de las plantas (Kai *et al.*, 2006).

Las cumarinas representan una importante familia de origen natural y/o sintético con heterociclos que contienen oxígeno produciendo un marco típico de benzopirona (Figura 2) (Venugopala *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2015). Son una clase de lactonas estructuralmente constituidas por un anillo de benceno fusionado a un anillo de  $\alpha$ -pirona, y se consideran derivados del ácido orto-hidroxi-cinámico (Matos *et al.*, 2015). Se sintetizaron por primera vez en 1868, y han sido utilizadas en la industria farmacéutica como precursores de la síntesis de un gran número de anticoagulantes (Barcellona *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2015).



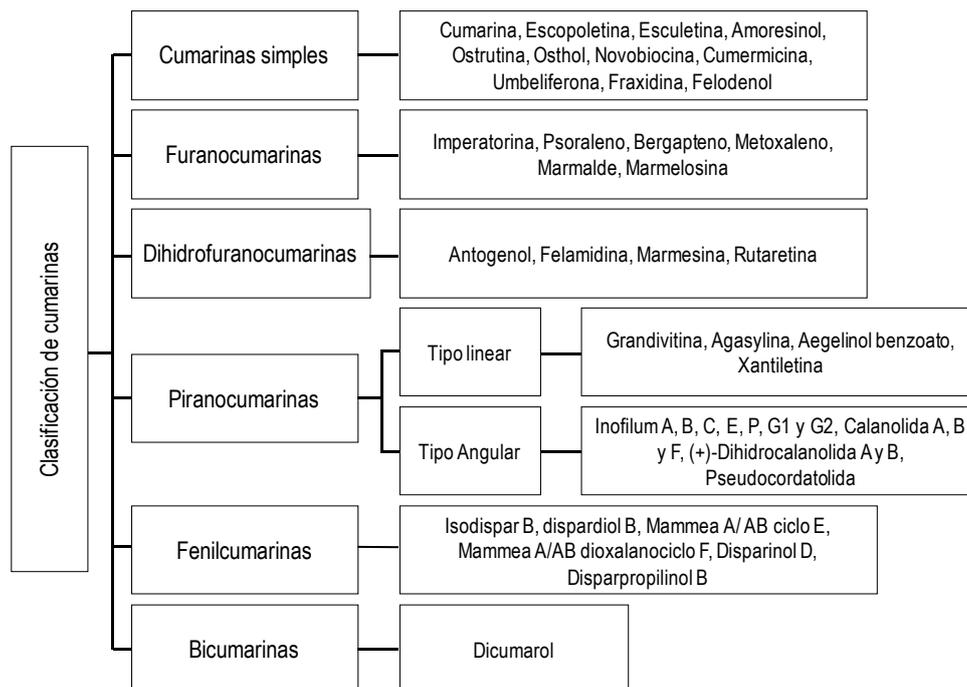
**Figura 2** – Estructura química de una cumarina junto con su numeración IUPAC (Venugopala *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2015).

Las plantas biosintetizan estos compuestos a partir de fenilalanina vía ácido shikímico (Figura 3). Las cumarinas naturales son generalmente lactonas insaturadas y comprenden otra clase de compuestos  $C_6C_3$ . Casi todas las cumarinas tienen un sustituyente oxigenado en la posición 7, ya sea libre, como en umbeliferona hidroxilada, o combinado (metil, azúcar, etc.) en otros derivados. Estructuralmente se consideran derivados del ácido orto-hidroxi-cinámico (Matos *et al.*, 2015).



**Figura 3** – Ruta de fenilpropanoides, que conduce a las rutas de síntesis de cumarinas. Las rutas en gris han sido establecidas de forma inequívoca. Los compuestos glicosilados no se muestran para mayor calidad. Las enzimas con un signo de interrogación son hipotéticas. R = CO<sub>2</sub>H o CO-SCoA C2H, ácido cinámico 2-hidroxilasa; C4H, ácido cinámico 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato: CoA ligasa; CO2H, ácido 4-cumárico 2-hidroxilasa; HCT, hidroxicinamoil-transferasa; CAOMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; CCoAOMT, cafeoil CoA O-metiltransferasa, CA2H, ácido cafeico 2-hidroxilasa (Bourgaud et al., 2006).

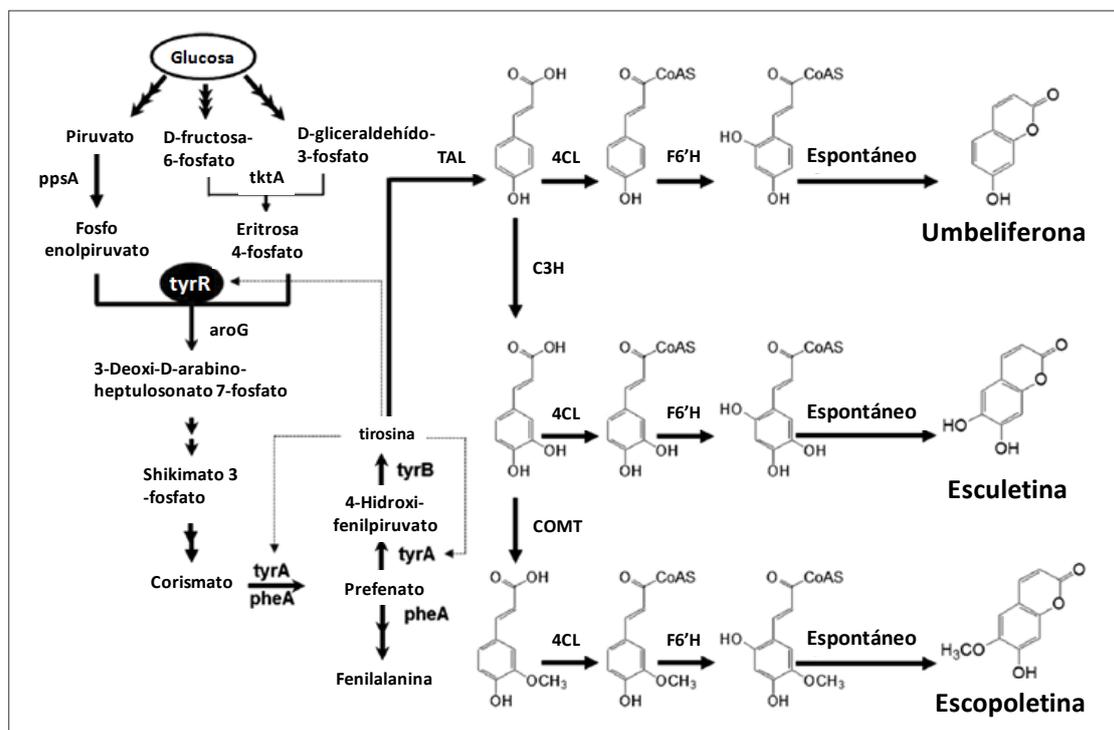
Existen diferentes clasificaciones para los compuestos derivados de cumarinas. En general, se pueden clasificar de acuerdo a los núcleos más comunes: cumarinas simples, cumarinas complejas y cumarinas diversas. Las cumarinas más complejas generalmente aparecen fusionadas con otros heterociclos. Los principales constituyentes de cumarinas aislados en plantas incluyen: hidroxycumarinas simples, furocumarinas e isofurocumarinas, piranocumarinas, biscumarinas y dihidroisocumarinas (Figura 4) (Venugopala *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2015).



**Figura 4** – Principales tipos de cumarinas aisladas de plantas (adaptado de Venugopala *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2015).

El presente Trabajo se centrará en las cumarinas simples, incluyendo escopoletina, esculetina y umbeliferona entre otras. Éstas derivan biogénicamente del ácido shikímico, vía ácido cinámico. En la Figura 5 se muestra su ruta de biosíntesis a partir de glucosa.

En un estudio desarrollado por Ahl Goy y colaboradores (1993), se observó que el híbrido *Nicotiana glutinosa x Nicotiana debneyi* contenía más escopoletina y escopolina (que es el nombre que recibe la escopoletina unida a una molécula de glucosa) en sus hojas basales, respecto a las correspondientes plantas no híbridas. En este mismo estudio, se analizó la actividad antiviral de ambos compuestos frente al virus del mosaico del tabaco (TMV) observándose que la pulverización de escopoletina sobre la planta infectada reducía el número de lesiones locales, sin afectar al tamaño de éstas. Sin embargo, no se observó efecto alguno al tratar con escopolina las plantas infectadas.



**Figura 5** – Ruta de biosíntesis de cumarinas partiendo de glucosa. *ppsA*, fosfoenolpiruvato sintetasa; *tktA*, transketolasa; *tyrR*, fenilalanina represor de la transcripción de unión al DNA; *aroG*, deoxifosfoheptonato aldolasa; *tyrA*, prefenato dehidrogenasa; *pheA*, prefenato dehidratasa; *tyrB*, fenilalanina aminotransferasa; *TAL*, tirosina amino liasa; *4CL*, 4-cumaroil-CoA ligasa; *C3H*, cumarato 3-hidroxilasa; *COMT*, ácido cafeico O-metiltransferasa; *F6'H*, feruloil CoA 6'-hidroxilasa. La tirosina inhibe *tyrR* y *tyrA* (adaptado de Yang et al., 2015).

En otro trabajo, El Modafar y colaboradores (1993), observaron que el árbol *Platanus acerifolia* era capaz de resistir a la infección del hongo patógeno *Ceratocystis fimbriata platani* (*Cfp*). *Cfp* penetra por medio de heridas, tanto de la raíz como de la parte aérea, provocando la muerte del árbol transcurridos cinco años desde que se produce la infección. En este estudio se muestra cómo un árbol de *Platanus acerifolia* que resiste a la infección, acumula umbeliferona y escopoletina en el tallo infectado. Sin embargo, estos dos compuestos hidroxicumáricos no presentaban acumulación en tallos sanos. Además, se observó que ambos metabolitos disminuyen el crecimiento de hongos. Mediante ensayos *in vitro*, estos autores observaron que escopoletina y umbeliferona tenían una capacidad similar para inhibir la germinación de los conidios de *Cfp*. Para concentraciones similares a las detectadas en los tejidos infectados siete días después de la inoculación, la inhibición de la germinación fue del 100% con umbeliferona y en torno al 80% con escopoletina. Estos autores observaron que la toxicidad de la escopoletina y la umbeliferona depende del estado de desarrollo del hongo, siendo la germinación de los conidios dos veces más sensible que el crecimiento micelial.

### 2.2.1. Escopoletina

La escopoletina (6-metoxi-7-hidroxicumarina) es una fitoalexina típica que, junto con su glicósido escopolina, es un importante metabolito secundario sintetizado en plantas como

mecanismo de defensa frente a diversos estreses ambientales (Siwinska *et al.*, 2014). Su síntesis se activa una vez que se ha producido algún tipo de infección en las plantas, pero también puede ser desencadenada debido a diversos tipos de estrés abiótico. Diversos estudios metabólicos han mostrado la acumulación de esta sustancia en los tallos y raíces de *Arabidopsis* (Bednarek *et al.*, 2005; Bourgaud *et al.*, 2006). Como se describe para otros metabolitos secundarios, la escopoletina es glicosilada a escopolina en el citosol, siendo posteriormente transferida a la vacuola (Bourgaud *et al.*, 2006). Se trata de un mecanismo muy común para el almacenamiento de muchos metabolitos (Werner y Matile, 1985; Taguchi *et al.*, 2000a; Dean *et al.*, 2005).

La escopoletina es un compuesto cumárico importante en *Arabidopsis*, pero también se ha encontrado en otras muchas especies de plantas (por ejemplo, en Solanáceas, como tabaco o patata, y en girasol, entre otras), mostrando actividad antifúngica y antibacteriana (Andreae, 1948; Tal y Robeson, 1986; Costet *et al.*, 2002; Siwinska *et al.*, 2014). Su acumulación se ha correlacionado con la resistencia a ataques microbianos y a otros estreses, así como a daño mecánico y deshidratación (Tanaka *et al.*, 1983). Además, parece ser el producto que más aumenta su concentración en las plantas infectadas en comparación con otras cumarinas y glicósidos cumáricos, como la escopolina, esculetina y esculina (Uritani, 1999; Buschmann *et al.*, 2000; Giesemann *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Esculetina

La esculetina (6,7-dihidroxicumarina) es un compuesto cumárico natural aislado de varias especies de plantas, tales como *Cichorium intybus* L., *Artemisia capillaris*, *Citrus limonia* y *Euphorbia lathyris*. Estudios previos han mostrado que la esculetina posee múltiples actividades farmacológicas, incluyendo efectos antioxidantes, antiinflamatorios y hepatoprotectores (Zhu *et al.*, 2016).

En un estudio publicado en 2016 por Sheyn y colaboradores, se llevó a cabo la caracterización de las alteraciones en el metabolismo de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno), explorando su papel durante la infección del alga *Emiliania huxleyi* con el virus EhV (*E. huxleyi* Virus). Durante la infección, se observó un aumento de glutatión reducido (GSH) y de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A su vez, la infección causó un aumento de la actividad peroxidasa en el cultivo infectado respecto al control no infectado. En consecuencia, se utilizó esculetina, que es un inhibidor conocido de la actividad peroxidasa y se observó que ésta abolió completamente tanto la muerte celular inducida por el virus como la producción viral.

### 2.2.3. Umbeliferona

La umbeliferona, también conocida como 7-Hidroxicumarina, se encuentra en una gran cantidad de plantas, especialmente en la familia *Umbelliferae* (umbelíferas o apiáceas), de cuyo nombre deriva. Se observó que esta hidroxycumarina también se acumula en plantas herbáceas

con infecciones fúngicas, bacterianas y/o virales, e incluso si son atacadas por insectos (Simkovitch y Huppert, 2015b).

Se produce a partir del ácido 4-cumárico o de sus éster-derivados. La conversión de ácido cinámico a ácido 4-cumárico es catalizada por la cinamato 4-hidrolasa, una citocromo P450 monooxigenasa de la familia CYP73A (Teutsch *et al.*, 1993; Bourgaud *et al.*, 2006). El ácido 4-cumárico es orto-hidroxilado a ácido 2,4-dihidroxicinámico (Kindl, 1971; Bourgaud *et al.*, 2006). Esta enzima convierte lentamente el ácido cinámico a *o*-cumárico, pero es más activa al transformar el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico, respectivamente a umbeliferona y escopoletina.

Simkovitch y Huppert (2015b) describieron cómo las plantas y los árboles emplean procesos fotoprotolíticos de hidroxycumarinas electrónicamente excitadas para hacer frente a hongos, bacterias e infecciones virales. La umbeliferona, al ser una fotobase, puede reaccionar de forma eficiente, en un estado excitado, con potenciales donadores de protones, como los ácidos glutámico y aspártico, mediante la abstracción de un protón a partir de estos ácidos y otros sitios más débilmente acidificados de los hongos. Anteriormente, estos autores habían propuesto que la fotoacidez del resveratrol podía ser utilizada por las plantas para resistir a hongos (Simkovitch y Huppert, 2015a). Se encontró que esta fitoalexina es un fotoácido débil y puede transferir un protón para acelerar iones en una solución acuosa. Estos autores proponen que el resveratrol en hojas de vid infectadas con hongos se excita por la luz UV y se somete a un proceso de transferencia de protones en estado excitado. La umbeliferona es un fotoácido mucho más fuerte que el resveratrol y es también una fotobase, por lo que puede reaccionar tanto con los ácidos como con las bases en la región infectada de las plantas cuando dicha región está expuesta a la luz solar.

### **3. Modificaciones de los metabolitos secundarios**

A través del metabolismo secundario, las plantas producen una gran diversidad de compuestos de bajo peso molecular y complejas estructuras. Además de por la enorme cantidad de rutas metabólicas implicadas, la variedad de estos compuestos es aún mayor gracias a modificaciones adicionales como hidroxilación, metilación, acilación o conjugación (Gachon *et al.*, 2005). La glicosilación o conjugación a una molécula de azúcar es una de las modificaciones más comunes de los metabolitos secundarios relacionada con la regulación, y la llevan a cabo unos enzimas denominados glicosiltransferasas (GTs).

#### **3.1. La glicosilación en plantas e implicaciones fisiológicas de la glicosilación de metabolitos**

En las plantas superiores, los metabolitos secundarios son a menudo convertidos en glicoconjugados, que usualmente se acumulan y compartimentan en las vacuolas. Tales

reacciones de glicosilación son catalizadas por las glicosiltransferasas (GTs) (Taguchi *et al.*, 2000b). Las GTs catalizan la transferencia de azúcares activados a una amplia gama de moléculas aceptoras, formando enlaces glicosídicos y, de ese modo, regulando las propiedades de los aceptores como su bioactividad, solubilidad y transporte (Zhang *et al.*, 2016).

Se han postulado varias funciones para la glicosilación de los compuestos de bajo peso molecular de las plantas: (1) La glicosilación permite la solubilización de los compuestos en agua, (2) actúa para detoxificar metabolitos o compuestos ambientales dañinos, como herbicidas, o (3) puede regular la acción de los compuestos funcionales, como las hormonas de plantas (Taguchi *et al.*, 2000b).

En la actualidad, las GTs se han clasificado en 97 familias basándose en el reconocimiento del sustrato y las relaciones de secuencia. Por ejemplo, la familia 1 está relacionada con las biotransformaciones de moléculas pequeñas, esencial para mantener el metabolismo secundario. Las GTs de esta familia utilizan por lo general la UDP-glucosa como sustrato donador de azúcar, por lo que se denominan UDP-glicosiltransferasas (UGTs) (Zhang *et al.*, 2016). Cuando un aceptor presenta múltiples sitios de enlace para un azúcar, las UGTs muestran regioselectividad mediante la transferencia de un azúcar a una posición específica. Esto se ha demostrado para diferentes cumarinas (Lim *et al.*, 2003; Le Roy *et al.*, 2016) y flavonoides para los que se evaluó dicha regioselectividad (Jackson *et al.*, 2011; Le Roy *et al.*, 2016).

La conjugación de las moléculas aceptoras como hormonas, xenobióticos o metabolitos secundarios mediante la acción de UGTs permite a las células vegetales modular sus propiedades bioquímicas, y así tener una fuerte influencia en su actividad biológica y almacenamiento (Le Roy *et al.*, 2016).

Se ha observado que las glicosiltransferasas de metabolitos secundarios presentan un motivo altamente conservado de 44 aminoácidos conocido como PSPG (*Plant Secondary Product Glycosiltransferase*) involucrado en la unión del azúcar uridinilado (Mackenzie *et al.*, 1997; Hirade *et al.*, 2015; Le Roy *et al.*, 2016) (Figura 6). Este motivo incluye también una secuencia de unos 25 aminoácidos que suele estar presente en todas las GTs. Dicha secuencia, localizada en la región C-terminal de la proteína, parece ser el sitio de unión del UDP (Kubo *et al.*, 2004; Hans *et al.*, 2004). Exceptuando el motivo PSPG, la similitud de secuencia entre las GTs es, por lo general, muy baja (en torno al 10%). En cuanto al extremo N-terminal, parece que éste podría ser el encargado de interactuar con el sustrato aceptor del azúcar (Moehs *et al.*, 1997; Lim y Bowles, 2004).



**Figura 6** – Secuencia consenso de las glicosiltransferasas de metabolitos secundarios. Los aminoácidos destacados en rojo tienen un porcentaje de conservación superior al 80%, los destacados en azul, >50% y los señalados en negro, <50% (Adaptado de Vogt y Jones, 2000; Gachon *et al.*, 2005).

### 3.2. La glicosilación en la respuesta defensiva

La glicosilación de los metabolitos secundarios juega un papel importante en la homeostasis celular, por medio de la alteración de su actividad, estabilidad, localización, biosíntesis y detoxificación (Lim y Bowles, 2004; Simon *et al.*, 2014). Esta glicosilación está asegurada por las GTs (UGTs) pertenecientes a la multigénica familia 1 de GTs de plantas (Simon *et al.*, 2014).

Las cumarinas son metabolitos secundarios comunes que se encuentran en muchas familias botánicas. Se ha visto que forman parte de la defensa de las plantas mostrando, por ejemplo, actividad antimicrobiana, capacidad para disuadir el ataque de herbívoros y un efecto de protección contra la radiación ultravioleta. La mayoría de las cumarinas en plantas superiores existen como glicoconjugados y parecen estar acumuladas en las vacuolas (Taguchi *et al.*, 2000b).

La escopolina es un 7-*O*-glucoconjugado de escopoletina. La conversión de escopoletina a escopolina es catalizada por una escopoletina glucosiltransferasa (SGTasa). En un estudio desarrollado por Taguchi y colaboradores (2000b), el nivel de escopolina acumulado en cultivos celulares de tabaco, aumentaba con la activación de la SGTasa cuando eran tratadas con 2,4 dihidroxibenzoico (2,4-DHBA). En este mismo estudio, se consiguió purificar la enzima UDP-glucosa:hidroxycumarina 7-*O*-glucosiltransferasa (CGTasa), que cataliza la formación de escopolina a partir de escopoletina, a partir de un cultivo de células de tabaco tratado con 2,4-DHBA. La enzima purificada presenta una mayor afinidad por hidroxycumarinas como sustrato, pero también mostró una actividad significativa frente a flavonoides. El análisis comparativo de la secuencia de aminoterminal de CGTasa reveló la existencia de una fuerte similitud con las secuencias de aminoácidos de otras glicosiltransferasas en plantas (Taguchi *et al.*, 2000b).

En un estudio llevado a cabo en 2002, Chong y colaboradores mostraron que la glicosilación de los fenilpropanoides en tabaco jugaba un papel importante durante la infección con el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) y que regulaba *corriente abajo* el gen de la glicosiltransferasa TOGT1, dando lugar a una susceptibilidad frente a TMV. Los autores sugieren que la escopolina es una forma de almacenamiento de la forma aglicona de la escopoletina, que

funcionaría como un agente antiviral potencialmente implicado en la acumulación de ROS durante la infección.

De entre las glicosiltransferasas que se han visto implicadas en defensa, algunas regulan los niveles activos de SA, que es la molécula señal implicada en el establecimiento de HR y SAR, mientras que otras regulan los niveles activos de ciertas fitoalexinas y moléculas antioxidantes, compuestos que intervienen en la defensa de la planta en el momento de la entrada del patógeno y en la subsiguiente explosión oxidativa. Todo esto parece indicar que las GTs juegan un papel relevante en la respuesta defensiva de las plantas, modulando los niveles de ciertas moléculas que intervienen en dicha respuesta.

En 1998, O'Donnell y colaboradores identificaron un gen en tomate denominado *Tw1* (*Tomato wound induced 1*) que se inducía por herida, tratamientos con SA y otros compuestos de naturaleza fenólica, así como por interacciones patogénicas de tipo incompatible. No respondía, sin embargo, a aplicaciones exógenas de JA o ET. Se consideró entonces que este gen debía codificar una GT, debido a la homología que presentaba con las proteínas de esta familia. En nuestro laboratorio se realizó la caracterización de esta proteína, confirmando su actividad glicosiltransferasa, así como el estudio de su posible papel en la respuesta defensiva de la planta mediante infección bacteriana con *Pseudomonas* (Campos, 2014).

Por otra parte, en tabaco se había clonado y caracterizado otra GT, homóloga a *Tw1*, denominada TOGT, inducida por SA, por infección con TMV y también por  $\beta$ -megaspermina (un compuesto que desencadena HR en la planta). Se comprobó que esta proteína presentaba una elevada afinidad por el sustrato escopoletina (Chong *et al.*, 1999).

*Objetivos*

---

## **OBJETIVOS**

El objetivo del presente proyecto es el estudio del papel de la glicosiltransferasa *Tw1* en la respuesta defensiva de las plantas.

Para la consecución del objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Confirmar el patrón de inducción de *Tw1* en plantas de tomate.
- Caracterizar la actividad bioquímica *in vitro* de *Tw1* frente a distintos metabolitos de naturaleza fenólica y cumarinas.
- Caracterizar el papel de *Tw1* en la respuesta defensiva de plantas de tomate frente a una infección viral, empleando plantas transgénicas que silencian este gen.

## *Materiales y métodos*

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

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

Para la realización del presente proyecto se han empleado 2 líneas transgénicas de tomate, Twi1 1.1 y Twi1 28.3, las cuales tienen silenciada la expresión del gen *Twi1* (Campos, Tesis Doctoral, 2014), empleando como control plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) del cultivar 'Moneymaker' (cedido amablemente por el Dr. Jonathan Jones, The Sainsbury Laboratory, Norwich, Reino Unido), resistente al virus del mosaico del tomate (ToMV).

Las plantas transgénicas, además de silenciar el gen *Twi1*, son portadoras del gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa II), que confiere resistencia al antibiótico kanamicina en planta. Debido a la naturaleza heterocigota de las líneas transgénicas, puesto que nos encontramos en la generación T1, la selección de los transformantes se hace mediante germinación *in vitro* con el antibiótico kanamicina. Para llevar a cabo esta técnica, en primer lugar, se debe esterilizar las semillas mediante lavados en serie. Las semillas se envuelven en una tela de muselina o Miracloth. Se realizan un total de cuatro lavados en botes de vidrio autoclavados. El primero de ellos contiene una mezcla 1:1 de lejía y agua, a la que se le añade un 0.05% (v/v) de Tween-20 para romper la tensión superficial del líquido. Las semillas, dentro de su envoltorio, se mantienen 30 minutos en este medio, agitando suavemente cada 5. Los tres lavados siguientes son con agua, manteniendo sumergidas las semillas 5, 10 y 15 minutos, respectivamente, para eliminar gradualmente los restos de lejía del primer lavado.

Una vez esterilizadas, las semillas se siembran en botes de vidrio que contienen medio de germinación (Para 1 L: 4.4 g de sales minerales (MS) y 10 g de sacarosa en H<sub>2</sub>O a pH 5.7, al que se añaden 8 g de agar). Como se ha mencionado anteriormente, y con el fin de poder seleccionar plantas transgénicas que expresen el gen de resistencia a kanamicina, se añade dicho antibiótico estéril al medio de germinación, previamente autoclavado, en una proporción de 50 mg/L. Seguidamente los botes se dejaron en oscuridad a 4 °C durante 2 días, y a continuación se trasladaron a la cámara de cultivo.

Transcurridos entre 10-15 días desde el traslado, momento en el que ya se pueden diferenciar claramente las plántulas resistentes a kanamicina, éstas fueron trasplantadas y aclimatadas en el invernadero, a una temperatura comprendida entre los 25 y los 30 °C, con una humedad relativa entre el 50 y el 70% y con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Dicho trasplante se realizó en macetas (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro interior) que contenían turba y vermiculita al 50%. Se trasplantó una planta por maceta. Las plantas se sometieron a riego a manta automatizado dos veces al día en solución de Hoagland, tal y como se describe en Naranjo *et al.* (2003). Las plantas de tomate variedad 'Moneymaker', empleadas como control en los diferentes experimentos realizados en este trabajo, fueron tratadas del mismo modo, exceptuando la adición del antibiótico kanamicina al medio de germinación.

A su vez, se han empleado plantas de *Nicotiana benthamiana* mantenidas y propagadas en las instalaciones del IBMCP. Para su cultivo, se prepararon semilleros en vermiculita y, aproximadamente una semana después de la siembra, las plantas se trasplantaron a macetas en las condiciones descritas previamente.

## **2. Tratamientos del material vegetal**

### **2.1. Imbibición de las plantas en compuestos cumáricos**

Se realizaron tres experimentos con diferentes compuestos de origen cumárico: escopoletina, esculetina y umbeliferona. El tratamiento de las plantas de tomate se llevó a cabo mediante imbibición de explantes o "*stem feeding*", según Gu y colaboradores (2000). Para ello, se emplearon plantas de 4 ó 5 semanas, cortadas en bisel a la altura de los cotiledones. Los explantes se sumergieron por el tallo en tubos de plástico de 50 mL que contenían agua destilada más una disolución de escopoletina, esculetina o umbeliferona en acetona a una concentración final de 0.5 mM.

La tercera y cuarta hojas de los explantes fueron recogidas en nitrógeno líquido a los tiempos indicados (0, 1, 6, 24 horas después de iniciar el tratamiento) y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

### **2.2. Inoculación de las plantas con el virus del bronceado del tomate (TSVW)**

Las inoculaciones de las plantas de tomate se llevaron a cabo como se describe en López-Gresa *et al.* (2016). Para la preparación del inóculo, se homogeneizó 0.5 g de tejido foliar de tomate infectado y liofilizado, en 50 mL de tampón de inoculación (tampón fosfato 50 mM pH 7.2, NaCl 250 mM, Polivinilpirrolidona (PVP), 2-mercaptoetanol 10 mM, carbón activo, carborundum). El homogeneizado se empleó directamente como solución de inoculación. Un 25% de las plantas fueron utilizadas como plantas control (*mock*) de la infección, aplicando el mismo tampón, pero sin los 0.5 g de tejido foliar infectado.

A otro 25% de las plantas se le aplicó 10 mL del tampón de inoculación al que se le había añadido previamente (15 minutos antes de proceder a la inoculación) 1.1 mL de escopoletina, a una concentración final de 10 mM. Esta prueba se realizó con el fin de observar si la adición de escopoletina al tampón de inoculación podía afectar a dicha infección.

Se utilizaron plantas de 4 a 5 semanas de edad, en el estadio de cinco a seis hojas. Se aplicó la solución mediante fricción con ayuda de un bastoncillo de algodón, en la tercera y cuarta hoja de las plantas. A los 6 días se volvió a realizar el mismo procedimiento en la quinta y sexta hoja. Las muestras correspondientes a la quinta y sexta hoja, tanto de las plantas

infectadas como de las plantas *mock*, fueron tomadas a los tiempos indicados (6 y 8 días después de la segunda inoculación) y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

### **2.2.1. Estudio de la sintomatología**

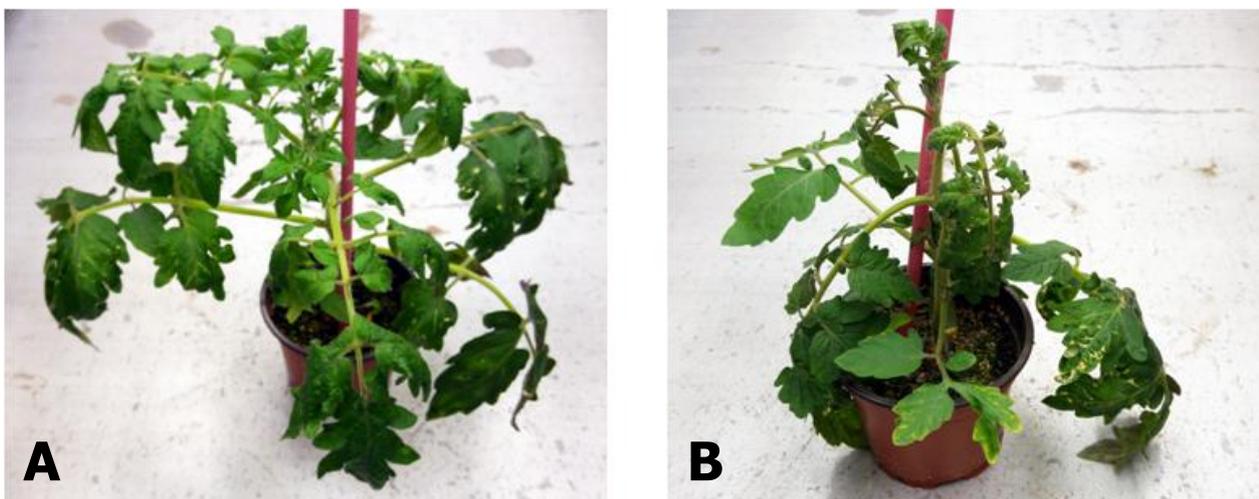
Los síntomas se evaluaron en las plantas de tomate infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) a los 6, 8, 10, 13 y 15 días después de la segunda inoculación, con el fin de llevar un correcto seguimiento de la infección.

Para el estudio de la sintomatología se estableció una escala de 0 a 4 como se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1** – Escala de sintomatología.

<b>Valor</b>	<b>Síntomas</b>
<b>0</b>	No se observa ningún síntoma
<b>1</b>	Los peciolos de las hojas se ven horizontales
<b>2</b>	Los peciolos de las hojas se ven caídos y los folíolos comienzan a mostrar epinastia y a enrollarse por las puntas. También se observa clorosis en los folíolos y en los cotiledones
<b>3</b>	Los peciolos de las hojas están casi verticales y los folíolos se muestran enrollados, más secos y con un mayor grado de epinastia
<b>4</b>	Los peciolos de las hojas están completamente verticales hacia abajo y presentan una epinastia muy pronunciada

En la Figura 7 se muestran dos plantas infectadas con el virus TSWV. La planta de la Figura 7A muestra un valor de infección de 1, en el que se puede apreciar la horizontalidad de los peciolos, mientras que la planta de la Figura 7B posee un valor de infección de 4, mostrando unos peciolos completamente verticales y con elevado grado de epinastia en los folíolos.



**Figura 7** – Imágenes de plantas infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). A) Valor 1 frente a B) valor 4 en la escala de sintomatología.

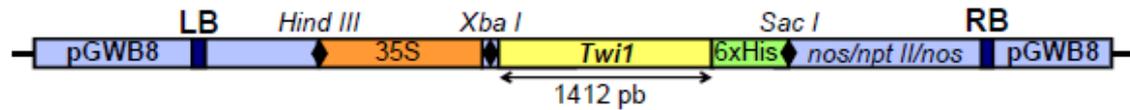
### **3. Toma de muestras**

En general, la toma de muestras del material se realizó recogiendo entre 0.5 y 1 g de tejido por planta, a los tiempos indicados en cada caso. El material se recogió sobre nitrógeno líquido en de tubos de plástico, siendo inmediatamente pulverizado y almacenado a -80 °C hasta el momento de realizar los distintos ensayos.

En el caso de plantas de tomate, se han analizado dos tipos de material vegetal: hojas y raíz. Para tejidos de hoja, se tomó como muestra la tercera y cuarta hoja de plantas de 4 a 5 semanas de edad, en el estadio de cinco a seis hojas; o la quinta y sexta hoja de plantas de 6 a 8 semanas de edad, en el estadio de siete a ocho hojas, en función del tipo de ensayo. La obtención de raíces se realizó a los diez días después de haber puesto a germinar las correspondientes semillas.

### **4. Plásmidos y cepas bacterianas utilizados**

Para llevar a cabo la purificación de Twi1, partimos de hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana* infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* portador de la construcción pGWB8\_*Twi1*. El plásmido pGWB8 tiene como factor de selección la resistencia a kanamicina y posee, por un lado, el promotor constitutivo 35S del virus CaMV (CaMV 35S) para la sobreexpresión del gen y, por otro, un *tag* o "cola" de histidinas (His<sub>6</sub>) (Nakagawa *et al.*, 2007). La traducción del plásmido pGWB8\_*Twi1* da lugar a una proteína recombinante (Twi1) con una extensión de seis residuos de histidina en su extremo C-terminal, lo que permite su inmunodetección con un anticuerpo antiHis, así como su purificación por cromatografía de afinidad en columna de níquel. La construcción pGWB8\_*Twi1* obtenida en el laboratorio se muestra en la Figura 8.



**Figura 8** – Obtención del clon de expresión para *Twi1*. Construcción de *pGWB8\_Twi1*. El promotor *35S* dirige la expresión del cDNA del gen *Twi1*. Se señala la longitud de los distintos cDNAs clonados. LB: borde izquierdo del plásmido binario; RB: borde derecho del plásmido binario.

Para la realización del presente Trabajo, partimos de líneas transgénicas generadas previamente en el laboratorio (Campos, 2014). Se utilizaron plantas transgénicas de tomate heterocigotas, generadas a partir de la transformación genética estable de explantes de cotiledón mediante cocultivo con *Agrobacterium* portador de la construcción *pART27\_Twi1* (Campos, 2014). Dicha construcción, mostrada en la Figura 9, da lugar a una horquilla o *hairpin* (hpRNA) que contiene fragmentos en sentido/antisentido de aproximadamente 300 pb separadas por un intrón y que desencadena el silenciamiento del gen *Twi1 in planta*. De entre las diferentes líneas obtenidas, se seleccionaron dos (RNAi *Twi* 1.1 y RNAi *Twi* 28.3) para la realización de los distintos ensayos.



**Figura 9** – Obtención del clon para el silenciamiento de *Twi1*. Construcción de *pART27\_Twi1*. El promotor *35S* dirige la expresión de los fragmentos del cDNA del gen *Twi1*, clonados en sentido y antisentido. Se señala la longitud de los distintos fragmentos de cDNAs clonados. LB: borde izquierdo del plásmido binario; RB: borde derecho del plásmido binario.

## 5. Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos

### 5.1. Extracción de RNA total en plantas

La extracción de RNA de las muestras recogidas de la planta se llevó a cabo empleando el reactivo TRIzol (Ambion Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evitar la degradación del RNA, las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso y las centrifugaciones se realizaron a 4 °C. El RNA total se cuantificó en un espectrofotómetro ultravioleta-visible Nanodrop ND-1000 a una absorbancia de 260 nm.

### 5.2. Reacciones de amplificación cuantitativa (qRT-PCR)

Posteriormente a su extracción, el RNA se precipitó mediante la adición de un volumen de LiCl 6 M. Transcurridas 2-3 horas, el sedimento fue lavado con LiCl 3 M y disuelto en agua libre de RNasa. Finalmente, para eliminar posibles contaminantes de DNA genómico, se añadieron 2 unidades de TURBO DNasa (Ambion) por cada  $\mu$ L de preparación de RNA. El análisis de RT-PCR cuantitativa se realizó como se describe en Campos *et al.* (2014). Se empleó

1 µg de RNA total para obtener el correspondiente cDNA, haciendo uso de oligo dT18 y el kit de reactivos PrimeScript RT (Perfect Real Time, Takara), según el protocolo del fabricante. El ensayo de PCR cuantitativa se llevó a cabo en presencia de 5x PyroTaq EvaGreen QPCR Mix Plus (ROX) (Cultek Molecular Biotek) y la amplificación fue monitorizada en tiempo real con el sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Life Technologies). El gen Factor de elongación 1 alfa (eEF1α) se utilizó como referencia interna del experimento. Los cebadores empleados para PCR cuantitativa se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2** – Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa. \* Los cebadores para el gen JAZ9 se tomaron de Ishiga et al. (2013).

Nombre del gen	Cebador directo (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
<i>Twi1</i>	GGATGCGAAGAGCTATGGAG	CGGACCAATAGCCCAATTTT
<i>PR1</i>	ACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCA	AGTAAGGACGTTGTCCGATCCAGT
<i>Tci21</i>	ACTCGTCCTGTGCTTTGTCC	CCCAAGAGGATTTTCGTTGA
<i>JAZ9 (*)</i>	TTTGGAGCTCACTCTTATGCCTCC	AGCTCAGTAGCATCGGAAACCACA

## 6. Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos

### 6.1. Extracción de compuestos fenólicos

Se tomó 0.5 g de cada muestra pulverizada de tejido y se maceró en mortero con 1.5 mL de metanol. A continuación, la muestra se pasó a tubos Eppendorf de 2 mL y fue sometida durante 10 minutos a ultrasonidos para terminar de romper el tejido vegetal, facilitando así la extracción. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL. El sedimento que quedó en el primer tubo Eppendorf fue resuspendido en 500 µL de metanol con ayuda de un vórtex, para proceder a una segunda extracción y centrifugación en las mismas condiciones que la anterior. Se recuperó de nuevo el primer sobrenadante recogido de la segunda extracción juntándolo con el de la extracción anterior. El volumen total recuperado de ambas extracciones fue dividido en dos partes iguales en viales de vidrio de 4 mL y secado en corriente de nitrógeno a una temperatura de 37 °C.

Una vez secas, las muestras se resuspendieron en 900 µL de tampón acetato sódico 0.1 M, pH 4.5. A continuación, se añadió a la mitad de las muestras 100 µL de una disolución del enzima β-glucosidasa (Sigma) preparada a 10 mg/mL en este mismo tampón, con el fin de liberar el SA y GA que se encontrasen conjugados en forma de β-glucósidos. A la otra mitad de las muestras, destinadas a la extracción de SA y GA en forma libre, se añadió únicamente 100 µL de acetato sódico, sin el enzima.

Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante la noche. Posteriormente, se adicionaron 77 µL de ácido perclórico (70% v/v) para alcanzar una concentración final del 5%, y a continuación se añadió 2.5 mL de una mezcla de acetato de etilo y ciclopentano (1:1, v/v),

formándose dos fases inmiscibles. Los compuestos fenólicos de interés se concentraron en la fase orgánica superior, que se recogió y se secó con corriente de N<sub>2</sub> seco en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las muestras secas se resuspendieron en 300 µL de metanol y se filtraron con ayuda de una jeringa de 1 mL a la que se le acopló un filtro de nylon de 13 mm y 0.45 µm de poro (Waters). De este modo, las muestras quedaron preparadas para el análisis por HPLC de fluorescencia.

## **6.2. Cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC**

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los extractos metanólicos se hicieron siguiendo los protocolos descritos en Yalpani *et al.* (1993) y Bellés *et al.* (1999). De los 300 µL de metanol en los que se resuspendió el extracto metanólico final, se inyectaron 30 µL en una columna de fase reversa Sunfire C18 (5 µm, 4.6 x 150 mm; Waters, Mildford, MA) equilibrada con ácido acético al 1% (J. T. Baker). Se aplicó un gradiente de metanol (0 a 100%) durante 20 min, con un flujo constante de 1 mL/min. Los compuestos fenólicos se detectaron con un detector de fluorescencia Waters 2475, empleando una  $\lambda$  de excitación de 313 nm y una  $\lambda$  de emisión de 405 nm. Para su cuantificación se elaboraron curvas patrón con distintas muestras de concentración conocida. De forma sistemática se empleaba el ácido ortoanísico como patrón interno, añadiendo una cantidad conocida a ciertas muestras (100 µL de una disolución 0.0625 mM) al inicio de la extracción, con el fin de determinar el porcentaje de pérdida de muestra durante todo el proceso.

## **7. Extracción y cuantificación de la actividad DPPH**

### **7.1. Extracción de compuestos metabólicos**

Se tomó 0.25 g de cada muestra pulverizada de tejido y se maceró en mortero con 2.5 mL de metanol. A continuación, la muestra se pasó a tubos Eppendorf de 2 mL y fue sometida durante 10 minutos a ultrasonidos para terminar de romper el tejido vegetal, facilitando así la extracción. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a viales de vidrio. El sedimento que quedó en el tubo Eppendorf fue resuspendido en 1 mL de metanol con ayuda de un vórtex, para proceder a una segunda extracción y centrifugación en las mismas condiciones que la anterior. Se recuperó de nuevo el sobrenadante recogido de la segunda extracción junto con el de la extracción anterior en el vial de vidrio. El volumen total recuperado de ambas extracciones se secó en corriente de nitrógeno a una temperatura de 37 °C y se conservó refrigerado hasta realizar la medición de la actividad antioxidante, la cual se basa en la estabilidad del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

### **7.2. Cuantificación la actividad DPPH**

En el momento de realizar la medición de la actividad antioxidante, se añade 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a los viales de vidrio que contienen las muestras previamente extraídas.

Tras agitar vigorosamente, se pasa a tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos. Se toma un volumen de 750  $\mu$ L y se pasa a Eppendorf de 2 mL.

Para la preparación del blanco se utilizaron 50  $\mu$ L de MeOH:H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y 1 mL de EtOH. Para establecer el valor 0 de la absorbancia se utilizaron 50  $\mu$ L de MeOH:H<sub>2</sub>O<sup>+</sup>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 750  $\mu$ L EtOH y 250  $\mu$ L de DPPH y para la medición de las muestras fueron necesarios 50  $\mu$ L de cada muestra, 750  $\mu$ L de EtOH y 250  $\mu$ L de DPPH. Para la preparación del DPPH a 0.5 mM se disolvieron 10 mg de DPPH en 50 mL EtOH.

Una vez preparadas las muestras, éstas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se procedió a la medición de la absorbancia con el espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 1000E, a una longitud de onda de 517 nm.

El porcentaje final de poder antioxidante para cada muestra se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$S = 100 - \left( \frac{A_x}{A_0} \right) \times 100$$

Donde S representa el porcentaje final de poder antioxidante, A<sub>x</sub> la absorbancia de cada muestra y A<sub>0</sub> la absorbancia establecida como valor 0.

## **8. Manipulación de proteínas**

### **8.1. Purificación de la proteína Twi1 recombinante**

Para llevar a cabo la purificación de Twi1, partimos de unos 4 g de tejido foliar de *N. benthamiana*, inoculado con el Agrobacterium portador de la construcción pGWB8\_*Twi1* para la sobreexpresión de este gen en plantas, así como plantas control agroinoculadas con el plásmido pGWB8 $\emptyset$  (Campos, 2014). El inóculo se infiltró con una jeringa sin aguja en las 4 primeras hojas de plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente un mes de edad. Transcurridos tres días desde la inoculación, se procedió a la recogida de muestras del material agroinfiltrado de cada planta para llevar a cabo el ensayo.

El material vegetal, congelado a -80 °C, se homogeneizó con mortero a 4 °C en tampón de extracción (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0.5 M e imidazol 40 mM, a pH 7.4, al que se añadió 10  $\mu$ L/mL de PMSF 1 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.2% (v/v)), a una relación de 2 mL de tampón por gramo de material. El homogeneizado se sometió a una centrifugación de 15 minutos a 4 °C y 29.220 x *g* y a una segunda centrifugación de 10 minutos en las mismas condiciones. A continuación, el sobrenadante se ultracentrifugó durante 5 min a 140.000 x *g*. Por último, la muestra se pasó a través de un filtro de nylon de 4 mm y 0.45  $\mu$ m de poro (Waters), obteniéndose así el extracto enzimático crudo.

El sobrenadante recuperado se sometió a purificación mediante FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) en el Servicio de Proteómica del IBMCP. La muestra se aplicó a una columna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences) y posteriormente se lavó con 2 mL de tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, 0.5 M de NaCl y 40 mM de imidazol, a pH 7.4) a un flujo de 1 mL/min. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente lineal de imidazol (40-500 mM en 30 mL del mismo tampón), midiendo la A280 a la salida de la columna y recogiendo fracciones de 500 µL en un colector automático RediFrac-1 (Amersham Pharmacia Biotech).

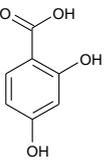
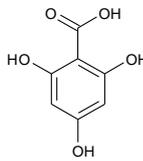
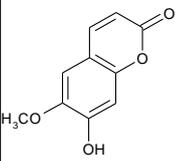
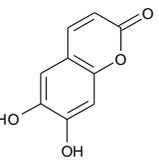
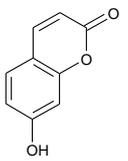
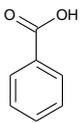
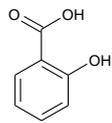
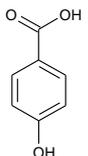
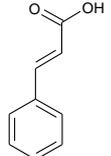
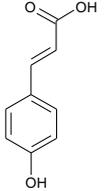
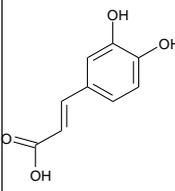
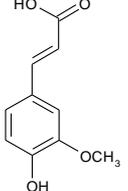
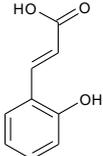
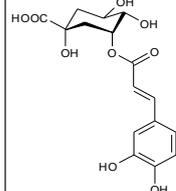
Se realizaron ensayos de actividad de aquellas fracciones en las que la absorbancia era significativa y diferencial frente a la muestra control. Previo a la realización del ensayo de actividad, estas fracciones fueron reunidas y filtradas por columnas PD-10 (Amersham Biosciences) equilibradas en el tampón de ensayo, con el fin de eliminar las sales y el imidazol presentes en la muestra.

## **8.2. Ensayo de actividad de la proteína *Tw1* recombinante**

Para llevar a cabo la reacción de conjugación se partió de 200 µL del extracto proteico purificado, al que se añadió 2.5 µL de una disolución 10 mM ó 100 mM del compuesto a ensayar, en función de su capacidad para emitir o no fluorescencia, respectivamente. A continuación, se añadió 4 µL de una disolución 100 mM de uridín difosfato glucosa (UDP-Glc, Fluka), compuesto empleado como sustrato donante de azúcar. Puesto que se había observado previamente actividad *in vitro* con los ácidos 2,4 dihidroxibenzoico (2,4-DHBA) y 2,4,6 trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA) (Campos, 2014), éstos fueron usados como control positivo. Todos los compuestos empleados en el ensayo de actividad, seleccionados en parte a partir del ensayo realizado previamente por Fraissinet-Tachet y colaboradores (1998) para la caracterización de una glicosiltransferasa, se muestran en la Tabla 3, junto con las cumarinas, y los hidroxibenzoatos utilizados como control positivo del experimento.

La reacción se incubó a 37 °C durante la noche, y se detuvo añadiendo un volumen de metanol al 100%. Posteriormente, la muestra se pasó por un filtro de nylon de 4 mm y 0.45 µm de poro (Waters). Se emplearon 40 µL para el análisis por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, en el caso de que el compuesto ensayado fuera capaz de emitirla, o bien 5 µL para el análisis por qToF, en los casos en los que el compuesto objeto de estudio no emitiese fluorescencia.

**Tabla 3** – Tabla de los diferentes compuestos usados como sustrato en la caracterización de la actividad *in vitro* de la proteína recombinante Twi1. El ensayo de actividad se llevó a cabo utilizando como sustratos cada uno de estos compuestos y el donante de azúcar UDP-glucosa (UDP-Glc). Los compuestos 2,4-DHA y 2,4,6-THBA, cuya actividad *in vitro* fue previamente estudiada por Campos (2014), son utilizados como control positivo.

 <p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">2,4-DHBA</p>	 <p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">2,4,6-THBA</p>	 <p style="text-align: center;">Escopoletina</p>	 <p style="text-align: center;">Esculetina</p>	 <p style="text-align: center;">Umbeliferona</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido Benzoico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido Salicílico</p>
 <p style="text-align: center;">Ácido p-Hidroxibenzoico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido Cinámico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido p-Cumárico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido Caféico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido Ferúlico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido O-Cumárico</p>	 <p style="text-align: center;">Ácido Clorogénico</p>

### 8.3. Cuantificación por HPLC

Al tratarse de compuestos fenólicos, se empleó el mismo procedimiento que el explicado en el apartado 6.2.

### 8.4. Caracterización del tipo de enlace

Para elucidar de forma más precisa la naturaleza anomérica ( $\alpha$  o  $\beta$ ) del enlace glucosídico existente entre el compuesto y el azúcar, se realizó una hidrólisis enzimática de la reacción catalizada por la proteína purificada Twi1, con los enzimas  $\alpha$ -glucosidasa o  $\beta$ -glucosidasa.

La hidrólisis con  $\alpha$ -glucosidasa o  $\beta$ -glucosidasa se realizó tratando una disolución que contenía el compuesto objeto de estudio glucoconjugado disuelto en 200  $\mu$ L de acetato de sodio 50 mM (pH 4.5). La reacción se incubó durante 2 h a 37 °C. Se detuvo la reacción añadiendo 1 ml de metanol y se filtró mediante una jeringa de 1 mL acoplada a un filtro de nylon de 13 mm y 0.45  $\mu$ m de poro (Waters). Por último, las muestras se evaporaron mediante corriente de nitrógeno. Para el análisis por HPLC, cada muestra se resuspendió en 100  $\mu$ L de metanol.

## 9. Tratamiento estadístico de datos

La sintomatología de cada planta, monitorizada en los tiempos indicados anteriormente y puntuada de acuerdo a la severidad de sus síntomas, se analizó estadísticamente mediante el

test de Kruskal-Wallis (test no paramétrico equivalente a ANOVA de un factor). Este test se utilizó para comparar la sintomatología entre plantas control 'Moneymaker' y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 para cada tiempo. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada uno de los genotipos infectados.

El índice de infectividad consiste en el número de total de días en los que cada planta presenta síntomas, proporcionando así una medida de la demora del inicio de los síntomas. Los datos procedentes de un experimento representativo, a partir de tres ensayos independientes, se usaron para realizar el análisis estadístico mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Este test se usó para comparar los índices de infectividad entre cada genotipo. Un valor  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Para la realización de los correspondientes análisis estadísticos, se utilizó el programa SPSS v.19 (IBM).

## *Resultados y discusión*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Ensayo de actividad *in vitro* de la proteína recombinante Twi1

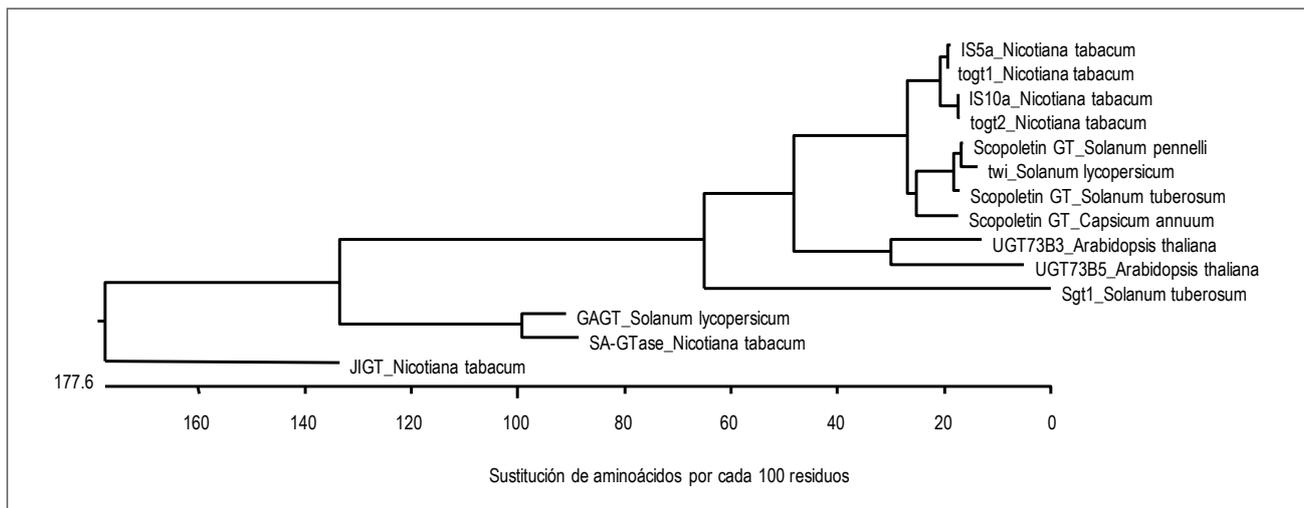
#### 1.1. Antecedentes

Se pretende abordar la caracterización de la actividad de la proteína de tomate inducida por herida *Twi1* (*Tomato wound-induced 1*), cuya secuencia de cDNA se había obtenido previamente en nuestro laboratorio mediante el rastreo de una genoteca de expresión en tomate (Tárraga, 2006). Dicha proteína fue identificada como posible glicosiltransferasa debido a su homología con proteínas pertenecientes a esta clase, según O'Donnell y colaboradores (1998). En este mismo trabajo, observaron que el gen que codifica *Twi1* mostraba inducción por herida, así como por tratamientos con ácido salicílico (SA) y análogos estructurales, correspondiendo una mayor inducción a los tratamientos con el propio SA, acetil SA (ASA) y ácido 2,6-dihidroxibenzoico.

Con el fin de caracterizar su posible actividad glicosiltransferasa y estudiar si los compuestos que inducían la acumulación de su transcrito podían ser además sustratos de la proteína, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un ensayo de actividad de la proteína recombinante *Twi1* frente a diferentes hidroxibenzoatos (Campos, 2014). Para ello se empleó UDP-glucosa como molécula donante del azúcar, debido a que es el sustrato más utilizado por las glicosiltransferasas (Lee y Raskin, 1999; Jackson *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2002; Seto *et al.*, 2009). En este ensayo se observó actividad *in vitro* frente a los sustratos ácido 2,4 dihidroxibenzoico y ácido 2,4,6 trihidroxibenzoico. Estos compuestos se emplearon como control positivo de la actividad en los ensayos que se detallan a continuación.

#### 1.2. Análisis filogenético de Twi1

A partir del alineamiento de secuencias de diferentes glicosiltransferasas de función conocida, se realizó un árbol filogenético para estudiar las posibles relaciones entre *Twi1* y otras glicosiltransferasas descritas (Figura 10). Se observa que *Twi1* presenta mayor similitud con las glicosiltransferasas que tienen escopoletina como sustrato.



**Figura 10** – Árbol filogenético de *Twi1* con diferentes glicosiltransferasas. Las glicosiltransferasas consideradas para el análisis fueron IS5a de *Nicotiana tabacum* (AAB36653), *togt1* de *Nicotiana tabacum* (AAK28303), IS10a de *Nicotiana tabacum* (AAB36652), *togt2* de *Nicotiana tabacum* (AAK28304), *Scopoletin GT* de *Solanum pennellii* (XP\_015062099), *twi1* de *Solanum lycopersicum* (CAA59450), *Scopoletin GT* de *Solanum tuberosum* (XP\_006346388), *Scopoletin GT* de *Capsicum annuum* (XP\_016539537), UGT73B3 de *Arabidopsis thaliana* (NP\_567953), UGT73B5 de *Arabidopsis thaliana* (NP\_179150) *Sgt1* de *Solanum tuberosum* (AAB48444), *GAGT* de *Solanum lycopersicum* (CAI62049), *SA-GTase* de *Nicotiana tabacum* (AAF61647) y *JIGT* de *Nicotiana tabacum* (BAA19155).

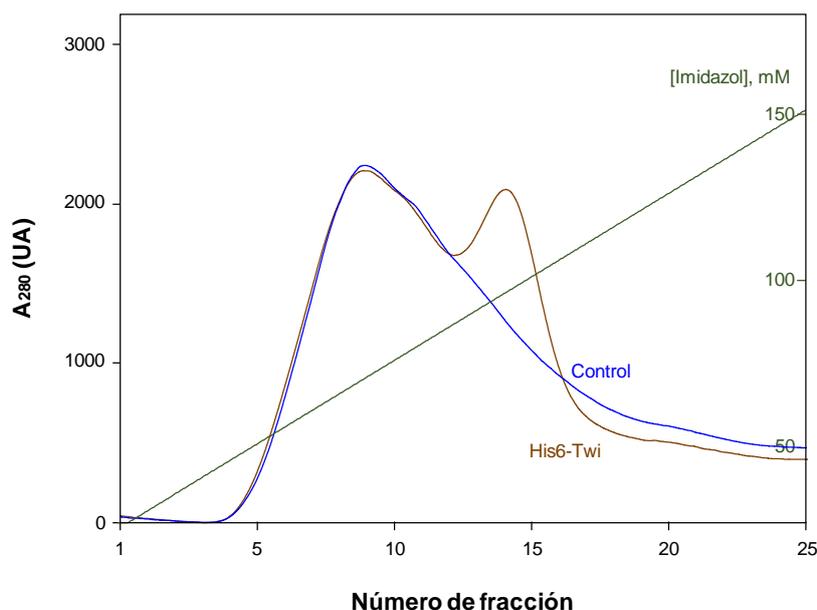
### 1.3. Inoculación de plantas de *Nicotiana benthamiana* con la construcción generada pGWB8\_ *Twi1*

Previamente se había obtenido en el laboratorio el cDNA completo que codificaba la proteína *Twi1* de tomate (Tárraga, 2006). Para poder estudiar la actividad de esta proteína, se obtuvo una construcción que permitiese llevar a cabo la sobreexpresión y el estudio de *Twi1* en plantas. Para ello, se clonó el cDNA completo de *Twi1* en el plásmido binario pGWB8, obteniéndose la construcción pGWB8\_ *Twi1*, tal y como se describe en Materiales y Métodos (Campos, 2014).

Se llevó a cabo un experimento de expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*, obteniendo la sobreexpresión de la proteína *Twi1* en plantas y permitiendo su purificación a partir de los tejidos agroinoculados, para así proceder a su caracterización bioquímica.

### 1.4. Purificación de la proteína recombinante *Twi1*

Partiendo del material vegetal agroinoculado con la construcción pGWB8\_ *Twi1*, se procedió a la extracción y purificación de la proteína recombinante *Twi1*. Esta proteína presenta en su extremo C-terminal una secuencia de 6 histidinas que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad basada en interacción con níquel, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos en la purificación de la proteína recombinante *Twi1* se muestran en la Figura 11.



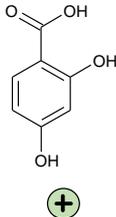
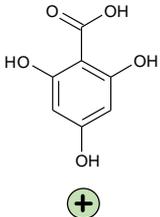
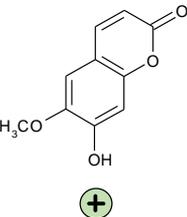
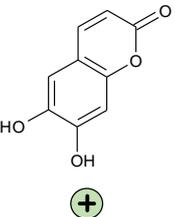
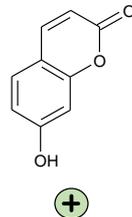
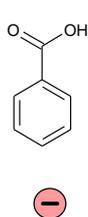
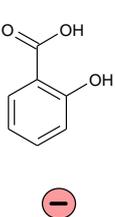
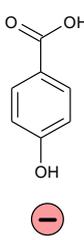
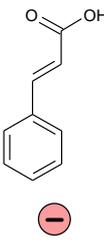
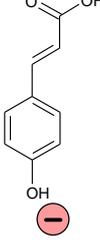
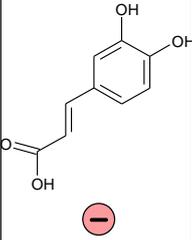
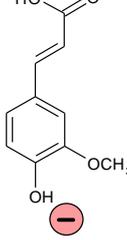
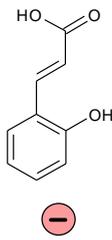
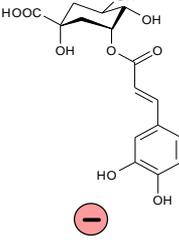
**Figura 11** – Purificación de *Twi1* recombinante producida por expresión transitoria en *N. benthamiana*. Se muestra el perfil de elución de extractos crudos procedentes de plantas control (en azul) y plantas agroinoculadas con la construcción pGWB8\_ *Twi1* (en marrón) al aplicar un gradiente de imidazol según se detalla en Materiales y Métodos. Las fracciones recogidas se analizaron por SDS/PAGE.

Como se puede observar, tras la aplicación de un gradiente de imidazol, se pudo recuperar la proteína *Twi1* a partir de las fracciones 13 a 16. Dicha proteína purificada fue utilizada para llevar a cabo los estudios de actividad bioquímica.

### 1.5. Ensayo de actividad de la proteína recombinante *Twi1*

Con el fin de caracterizar la función glicosiltransferasa de *Twi1* frente a diferentes posibles sustratos, llevamos a cabo un ensayo de actividad tal y como se describe en Materiales y Métodos. Transcurrido el tiempo de ensayo, las muestras fueron analizadas por HPLC, según se detalla en Materiales y Métodos, para observar la reducción de la cantidad de compuesto en su forma libre, así como la aparición de su forma conjugada. En primer lugar, se confirmó la actividad *in vitro* de *Twi1* respecto a los ácidos 2,4 dihidroxibenzoico (2,4-DHBA) y 2,4,6 trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA). A su vez, se observó una disminución en la cantidad de compuesto libre inicial, además de observarse la aparición de un nuevo compuesto, correspondiente a la forma conjugada, en las muestras correspondientes al ensayo de actividad frente a las cumarinas escopoletina, esculantina y umbeliferona. El resto de compuestos ensayados, cuya estructura aparece representada en la Tabla 4, no mostraron diferencias respecto a la cantidad inicial de compuesto libre. Se consideró, por lo tanto, que *Twi1* no mostraba actividad frente a dichos compuestos.

**Tabla 4** – Resultados cualitativos frente a diferentes compuestos usados como sustrato en la caracterización de la actividad *in vitro* de la proteína recombinante Twi1. El ensayo de actividad se llevó a cabo utilizando como sustratos cada uno de estos compuestos y el donante de azúcar UDP-glucosa (UDP-Glc).

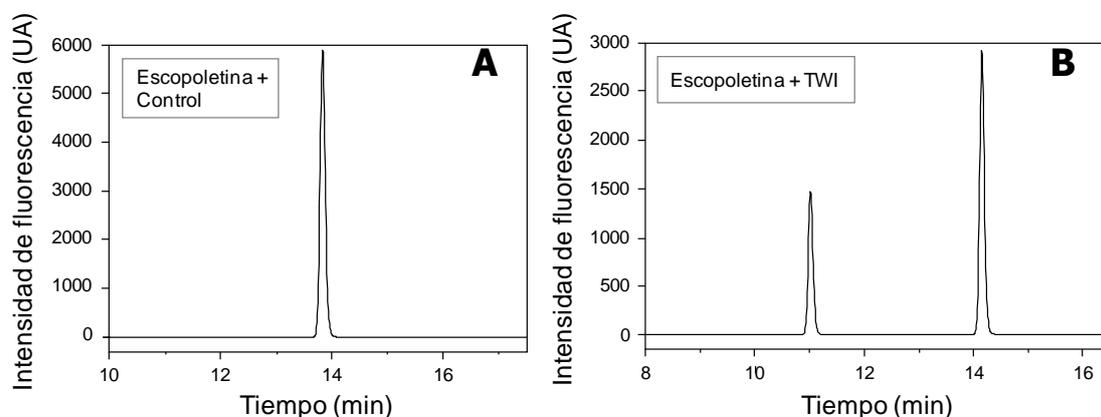
 <p>2,4-DHBA</p>	 <p>2,4,6-THBA</p>	 <p>Escopoletina</p>	 <p>Esculetina</p>	 <p>Umbeliferona</p>	 <p>Ácido Benzoico</p>	 <p>Ácido Salicílico</p>
 <p>Ácido p-Hidrobenzoico</p>	 <p>Ácido Cinámico</p>	 <p>Ácido p-Cumárico</p>	 <p>Ácido Caféico</p>	 <p>Ácido Ferúlico</p>	 <p>Ácido O-Cumárico</p>	 <p>Ácido Clorogénico</p>

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio realizado en nuestro laboratorio (Campos, 2014), corroborando la hipótesis de que Twi1 es una proteína de tipo glicosiltransferasa, que presenta actividad *in vitro* frente a los ácidos 2,4-dihidrobenzoico y 2,4,6-trihidrobenzoico, así como frente a las cumarinas escopoletina, esculetina y umbeliferona, empleando UDP-glucosa como molécula donante del azúcar.

La mayoría de las GTs descritas hasta el momento parecen ser específicas en cuanto al sustrato donante del azúcar empleado (Warnecke y Heinz, 1994; Lee y Raskin, 1999; Vogt y Jones, 2000; Kurosawa *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 2004; Seto *et al.*, 2009; Tárraga *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014), por lo que podríamos considerar que Twi1 es específica de UDP-glucosa.

### 1.6. Ensayo de actividad de la proteína recombinante Twi1, empleando escopoletina como sustrato aceptor del azúcar

Se muestra, a modo de ejemplo, el resultado obtenido durante el ensayo de actividad usando como sustrato el compuesto escopoletina. En la Figura 12A se puede observar un solo pico, correspondiente a la escopoletina, al analizar la muestra de un extracto proteico de plantas control al que se ha añadido UDP-glucosa y escopoletina como sustratos. Sin embargo, si se añaden estos mismos sustratos a un extracto proteico de plantas que sobreexpresan Twi1, se pueden diferenciar claramente dos picos: uno, correspondiente a la escopoletina, y otro perteneciente a la escopolina, su glucoconjugado, más polar (Figura 12B).

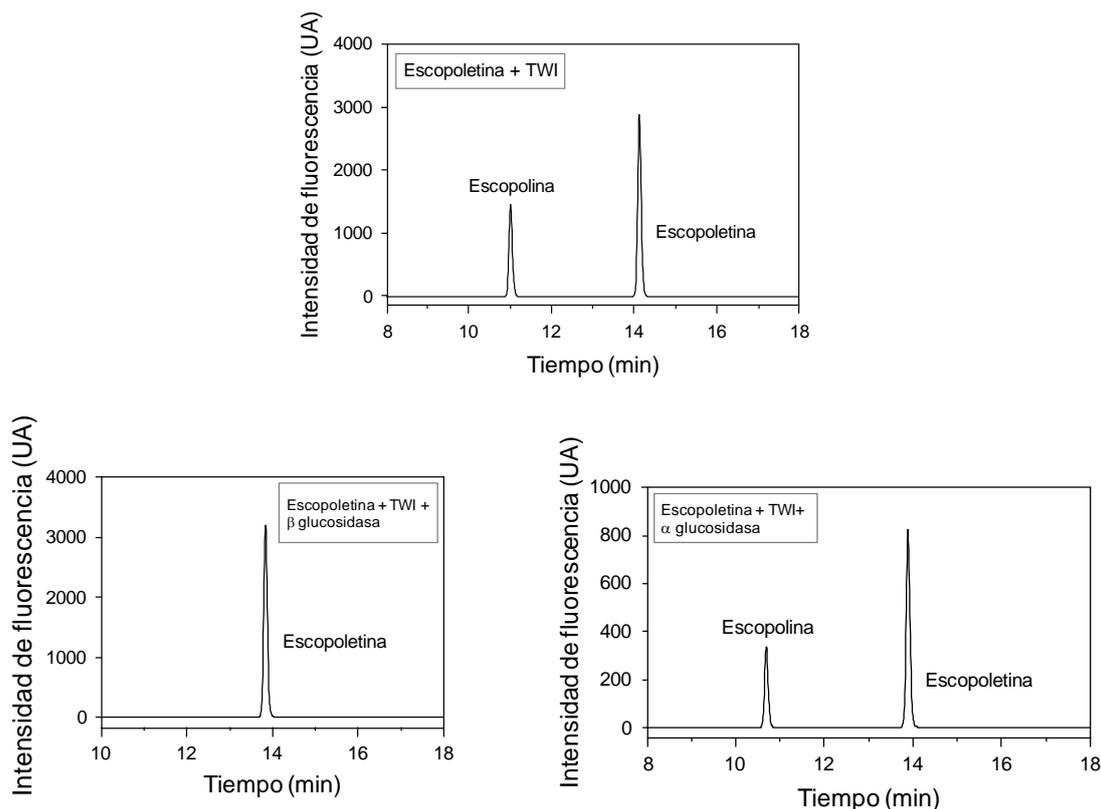


**Figura 12** – Resultado frente al compuesto escopoletina usado como sustrato en la caracterización de la actividad *in vitro* de la proteína recombinante *Twi1*. El ensayo de actividad se llevó a cabo utilizando como sustrato este compuesto y el donante de azúcar UDP-glucosa (UDP-Glc).

### 1.7. Caracterización del tipo de enlace

Una vez confirmada la actividad glucosiltransferasa de *Twi1* frente al compuesto escopoletina, se procedió a la caracterización del tipo de enlace formado entre ambos sustratos, escopoletina y glucosa, que puede ser alfa o beta glucosídico.

Para ello, se trató con  $\alpha$ -glucosidasa o  $\beta$ -glucosidasa una muestra conteniendo escopoletina y escopolina, su glucoconjugado, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos tras ambos tratamientos. El enzima  $\beta$ -glucosidasa provocó la ruptura del enlace formado entre escopoletina y glucosa, de modo que desaparece el pico correspondiente a escopolina y se observa únicamente el pico que se corresponde con la escopoletina. El tratamiento con  $\alpha$ -glucosidasa no mostró efecto sobre la muestra, pues se sigue observando la aparición de ambos picos, tanto escopoletina como escopolina. A la vista de estos resultados, podemos concluir que el tipo de enlace formado entre escopoletina y glucosa, reacción catalizada por la glucosiltransferasa *Twi1*, se trata de un enlace beta.



**Figura 13** – Perfiles de HPLC de escopoletina glicoconjugada con *Twi1* antes de la hidrólisis, después de la hidrólisis con  $\beta$ -glucosidasa y después de la hidrólisis con  $\alpha$ -glucosidasa.

## 2. Ensayo de actividad *in vivo* de la proteína recombinante *Twi1*

### 2.1. Antecedentes

La inducción del gen *Twi1* (*Tomato wound-induced 1*) fue descrita en tomate en respuesta a herida, infección con el hongo *C. fulvum* y tratamientos con compuestos de naturaleza fenólica, tales como el ácido salicílico (SA), por O'Donnell y colaboradores (1998). Posteriormente en nuestro laboratorio se observó la inducción de este gen en la infección de plantas de tomate con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (*Pst*) (Campos, 2014).

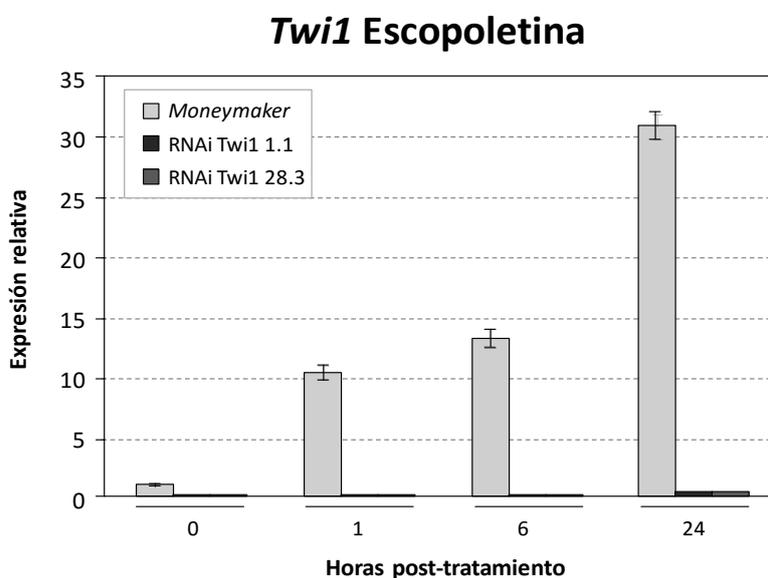
En nuestro laboratorio se había realizado previamente un estudio con el objeto de comprobar si los compuestos que actuaban como sustrato de *Twi1 in vitro* tenían capacidad de inducir el gen *Twi1 in vivo*. Para ello, se embebieron plantas de tomate 'MoneyMaker' mediante la técnica *stem-feeding* en disoluciones 2 mM de ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA), ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico (2,4,6-THBA) y ácido salicílico (SA) como control positivo (Campos, 2014). En dicho estudio, se apreció inducción de *Twi1* en plantas control con todos los tratamientos.

Por todo lo anterior, se quiso comprobar la inducción de la proteína *Twi1 in vivo* con los nuevos sustratos, las cumarinas, en plantas transgénicas RNAi *Twi1* frente a plantas control.

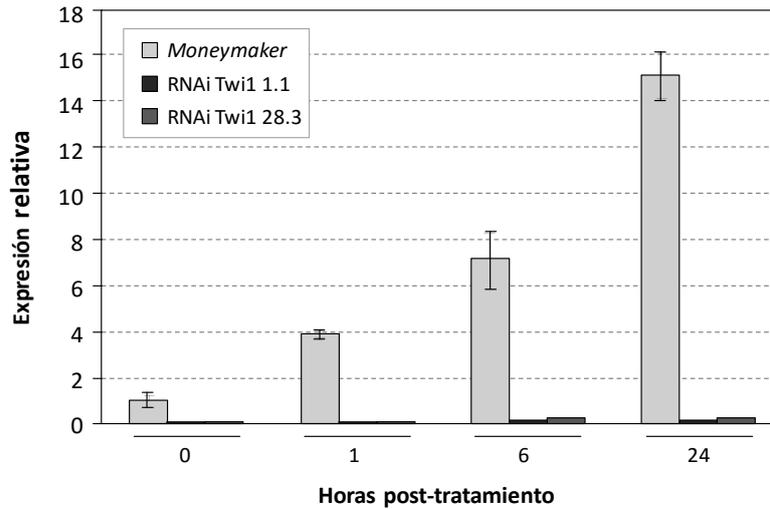
## 2.2. Tratamiento exógeno de plantas de tomate con los nuevos sustratos de *Tw1*

Con el fin de estudiar si los nuevos compuestos que actúan como sustrato de *Tw1* *in vitro* también tienen capacidad de inducir el gen *Tw1* *in vivo*, se embebieron plantas de tomate 'MoneyMaker' y plantas transgénicas *Tw1* 1.1 y *Tw1* 28.3, mediante la técnica *stem-feeding* en disoluciones 0.5 mM de escopoletina, esculetina y umbeliferona, como se detalla en Materiales y Métodos. Se recogieron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas después del tratamiento (hpt). Posteriormente, estas muestras se procesaron para llevar a cabo el estudio de la inducción de *Tw1*, *PR1* y *Tci21* mediante PCR cuantitativa.

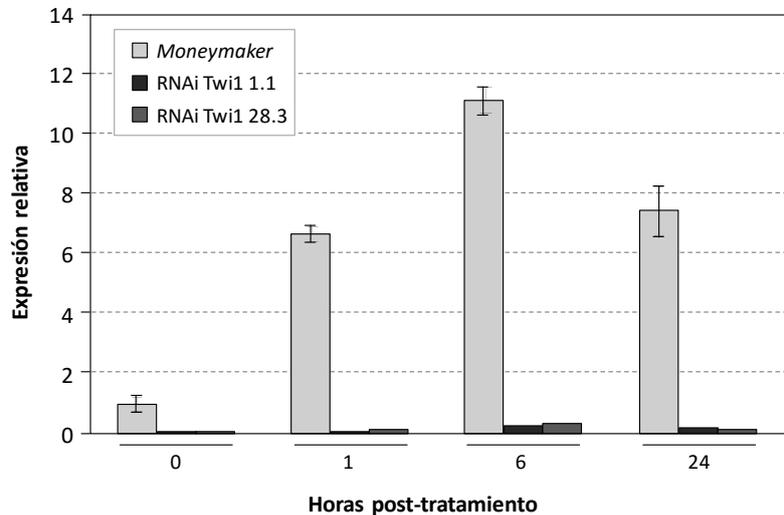
En las Figuras 14, 15 y 16 se confirma la inducción de *Tw1* debido al tratamiento con escopoletina, umbeliferona y esculetina, respetivamente, en las plantas control, estando esta inducción reprimida en las plantas transgénicas, debido al silenciamiento de este gen por RNAi.



**Figura 14** – Niveles de expresión del gen *Tw1* en plantas de tomate 'MoneyMaker' como control y transgénicas *Tw1* 1.1 y *Tw1* 28.3 tratadas con escopoletina. Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Tw1* en explantes embebidos en disoluciones 0.5 mM de escopoletina. Se recogieron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1α*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar el tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a muestras independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes para este compuesto.

***Twi1* Umbeliferona**

**Figura 15** – Niveles de expresión del gen *Twi1* en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* tratadas con umbeliferona. Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Twi1* en explantes embebidos en disoluciones 0.5 mM de umbeliferona. Se recogieron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1a)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar el tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a muestras independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes para este compuesto.

***Twi1* Esculetina**

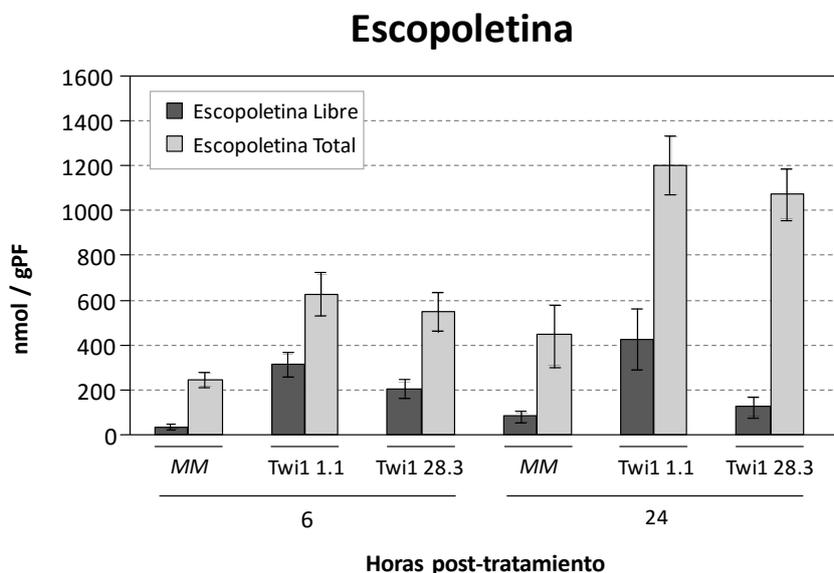
**Figura 16** – Niveles de expresión del gen *Twi1* en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* tratadas con esculetina. Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Twi1* en explantes embebidos en disoluciones 0.5 mM de esculetina. Se recogieron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1a)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar el tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a muestras independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes para este compuesto.

Los resultados de inducción de *Tw1* por tratamientos con escopoletina, umbeliferona y esculetina en plantas de tomate 'Moneymaker' corroboran los resultados obtenidos en el ensayo de actividad *in vitro*, y refuerzan la idea de que estos compuestos son posibles sustratos de *Tw1 in vivo*, o bien posibles análogos funcionales de otros sustratos fenólicos del enzima, ya que el tratamiento induce la expresión del gen que codifica la glicosiltransferasa *Tw1*. Cabe destacar que el mayor nivel de inducción de *Tw1* se observa en el tratamiento con escopoletina (se induce hasta un valor relativo máximo de 30) en comparación a la inducción generada por umbeliferona y esculetina (valores máximos de 25 y 11, respectivamente).

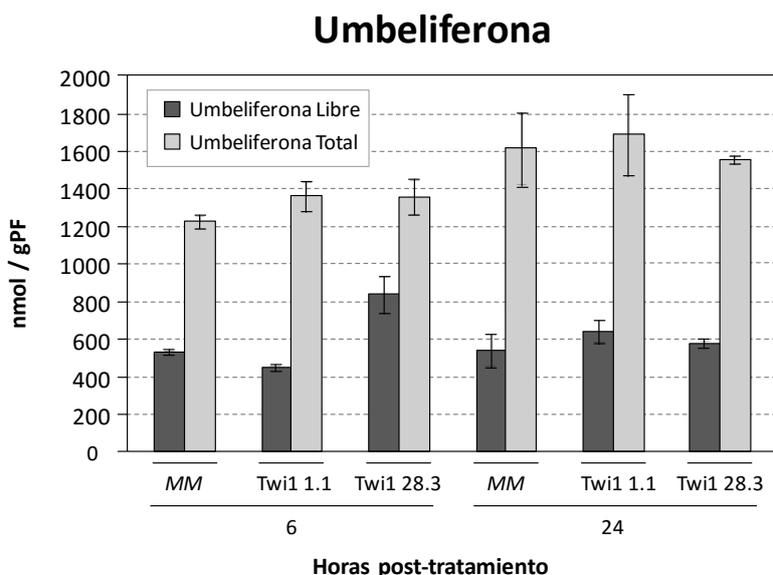
Nos propusimos a continuación cuantificar los niveles de acumulación de las diferentes cumarinas a lo largo del tratamiento, en las plantas transgénicas RNAi *Tw1* frente a las plantas control. Los resultados de acumulación de escopoletina se muestran en la Figura 17. Se observa un notable aumento de los niveles de escopoletina en las plantas, tanto en forma libre como total (suma de la forma libre más la forma conjugada), conforme aumenta el tiempo de imbibición. Ambas líneas transgénicas presentan un mayor nivel de acumulación respecto al control, tanto de escopoletina libre como de escopoletina total, transcurridas 6 y 24 horas desde el inicio del tratamiento.

Cabría esperar que el silenciamiento de una glicosiltransferasa produjese una mayor acumulación de su sustrato en forma libre. Coincidiendo con esto, las plantas transgénicas RNAi *Tw1* presentan mayores niveles de acumulación de escopoletina en forma libre. Resultados similares se obtuvieron en el silenciamiento de la glicosiltransferasa *WsSGTL1* en la especie *W. somnifera*, que presentaba mayores niveles de esteroides en forma libre (Saema *et al.* 2015) y de withanólidos en hoja (Singh *et al.*, 2016). Sin embargo, sorprende el hecho de que los niveles de escopoletina totales, es decir, la suma de las formas libre y conjugada, también sean más elevados en el caso de las plantas transgénicas silenciadas. Resultados *a priori* no esperados, se observaron también en plantas transgénicas de *Arabidopsis* con sobreexpresión de la glicosiltransferasa de SA denominada *AtSGT1*, que presentaron menores niveles de SA libre, pero también niveles inferiores de SA en forma glucosilada (Song *et al.* 2008). Por otra parte, plantas transgénicas de tabaco con sobreexpresión de *TOGT*, una glucosiltransferasa de escopoletina, presentaron mayor acumulación de este compuesto tanto en su forma libre como en su forma conjugada (Gachon *et al.*, 2004). En otro trabajo realizado por Lee y colaboradores (2009) el silenciamiento de *CaUGT1* en pimiento causó la disminución de los niveles de SA en forma libre y total en un 52% y un 48%, respectivamente. Al parecer, no existe una relación clara entre la sobreexpresión o el silenciamiento de una glicosiltransferasa y los niveles de compuesto libre y total de sus sustratos *in planta*. Esto podría deberse a la acción de otras glicosiltransferasas con función redundante a la proteína silenciada, en nuestro caso *Tw1*, que se induzcan como respuesta al silenciamiento, y que conjuguen escopoletina con gran eficiencia. Otra posible explicación, es que en ausencia de *Tw1*, otras proteínas actúen glucosilando escopoletina, pero de forma distinta a como lo hace *Tw1*, por ejemplo, conjugando

a otra molécula de azúcar distinta a la glucosa. Esto impediría la continuación de la ruta metabólica de transformación/degradación que sufriría este compuesto de haber sido glucosilado por Twi1, con lo cual se acumula en grandes cantidades en las plantas transgénicas silenciadas. Respecto a esta última hipótesis, sería interesante caracterizar el tipo de glicósido formado a partir de escopoletina libre en las plantas transgénicas RNAi Twi1.



**Figura 17** – Niveles de acumulación de escopoletina libre y total en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3. Se analizó por HPLC la acumulación de escopoletina libre y total en hojas de explantes embebidos en disoluciones 0.5 mM de escopoletina las 6 y 24 horas post-tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a muestras independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes para este compuesto.



**Figura 18** – Niveles de acumulación de umbeliferona libre y total en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3. Se analizó por HPLC la acumulación de umbeliferona libre y total en hojas de explantes embebidos en disoluciones 0.5 mM de umbeliferona las 6 y 24 horas post-tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a muestras independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes para este compuesto.

Los resultados de acumulación de umbeliferona, presentados en la Figura 18, muestran un aumento de la concentración de umbeliferona en forma conjugada conforme aumenta el tiempo de imbibición. A las 6 horas, ambas líneas transgénicas presentan un mayor nivel de acumulación con respecto al control, observándose lo contrario a las 24 horas.

Estos mismos ensayos se realizaron con esculetina, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las plantas transgénicas frente a las plantas control. Esto podría ser debido a la baja dilución del compuesto. Previamente, se había comparado la solubilidad de todos estos compuestos tanto en metanol como acetona, observándose que esta última los disolvía de manera más eficiente. No obstante, en el caso de la esculetina, la disolución en acetona no fue completa, por lo que se considera que podría haber interferido en los ensayos, y podría no haber sido absorbida correctamente por las plantas al no estar disuelta por completo.

Así pues, los estudios de actividad *in vitro* a partir de la proteína recombinante Twi1 han revelado que esta glicosiltransferasa es capaz de conjugar glucosa a las cumarinas escopoletina, esculetina y umbeliferona. Asimismo, hemos observado por qRT-PCR que tratamientos con estos compuestos inducen fuertemente el gen *Twi1* en el correspondiente control 'Moneymaker', quedando silenciado en las transgénicas. Estos tratamientos exógenos con diversos compuestos en plantas control y plantas transgénicas de tomate que silencian *Twi1* han permitido confirmar su actividad *in vivo*.

La escopoletina es el compuesto en donde se observan mayores diferencias entre las plantas 'Moneymaker' y las transgénicas, presentando unos buenos niveles de acumulación y conjugación en planta. A su vez, es la cumarina más presente en la bibliografía de los últimos años (Giesemann *et al.*, 2008; Venugopala *et al.*, 2013; Siwinska *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015). Por ello, consideramos que es el sustrato de mayor interés entre los identificados, y nos centraremos en ella para la continuación del presente Trabajo.

### **3. Estudio del papel de la escopoletina en defensa**

#### **3.1. Antecedentes**

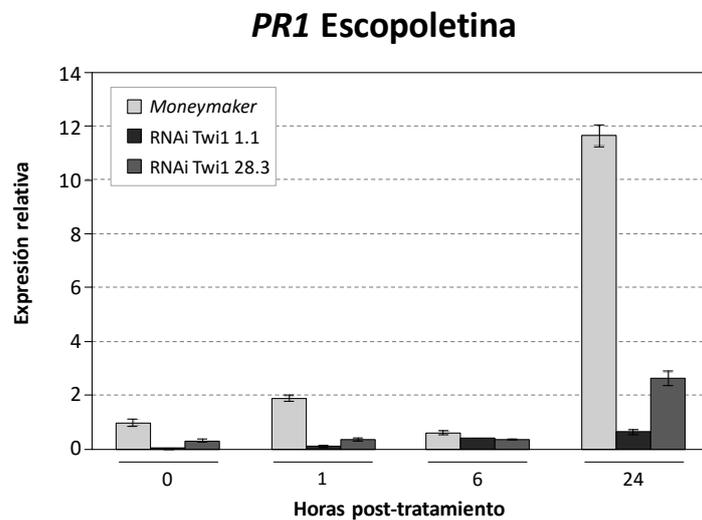
Se ha demostrado ampliamente la intervención de fitoalexinas en los mecanismos de resistencia en diversas interacciones planta-patógeno que implican hongos y bacterias. En la mayoría de los casos, la resistencia está ligada a la temprana producción de fitoalexinas después de la invasión del huésped por el patógeno (El Modafar *et al.*, 1993). Según estos autores, la actividad antifúngica de las fitoalexinas debería ocurrir en estadios tardíos de la infección, donde la escopoletina y la umbeliferona pueden jugar un papel importante en la restricción *in vivo* del desarrollo del parásito, inhibiendo su crecimiento y desarrollo.

En un estudio desarrollado por Ahl Goy y colaboradores (1993) se vio que el híbrido *Nicotiana glutinosa x Nicotiana debneyi* contenía entre 10 y 50 veces más escopoletina y entre 3 y 18 veces más escopolina en sus hojas basales, respecto a las correspondientes plantas no híbridas. Se observó que, al mezclar escopoletina con el inóculo viral, a una concentración final de 10 mM, el número de lesiones locales provocadas por el virus se reducía en un 50%. La aplicación de escopoletina mediante pulverización a diferentes concentraciones (3 mM y 10 mM) sobre la planta infectada redujo entre un 25% y un 40% el número de lesiones locales, respectivamente, sin ello afectar a su tamaño. Sin embargo, no se observó efecto alguno al tratar las plantas infectadas con escopolina.

Por todo ello, decidimos estudiar las consecuencias de la aplicación exógena de escopoletina y sus posibles efectos en la respuesta defensiva de las plantas.

### 3.2. Estudio de la acumulación de los genes de defensa PR1 y Tci21 por escopoletina

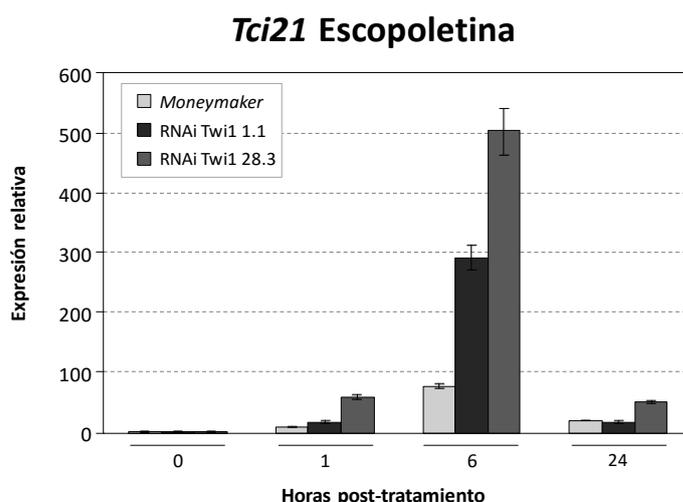
En una primera aproximación, se analizaron los niveles de expresión de genes relacionados con la defensa en plantas como son *PR1* y *Tci21*, genes marcadores de SA y JA respectivamente, con objeto de descubrir posibles variaciones que puedan ser consecuencia de la absorción de escopoletina.



**Figura 19** – Niveles de expresión del gen *PR1* en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* tratadas con escopoletina. Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *PR1* en explantes embebidos en disoluciones 0.5 mM de escopoletina. Se recogieron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1a)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar el tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a muestras independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes para este compuesto.

Los resultados de inducción de *PR1* en tratamientos con escopoletina, expuestos en la Figura 19, muestran un notable aumento de la expresión de este gen, concretamente a las 24 horas después del tratamiento en las plantas 'Moneymaker', observándose apenas inducción en las transgénicas.

En la Figura 20 se representan los resultados de la expresión de *Tci21* por tratamientos con escopoletina. Se puede observar un aumento notablemente mayor en el caso de las plantas transgénicas frente a las tomadas como control a las 6 horas después del tratamiento. Este aumento es máximo en el caso de la línea transgénica *Twi1 28.3*.



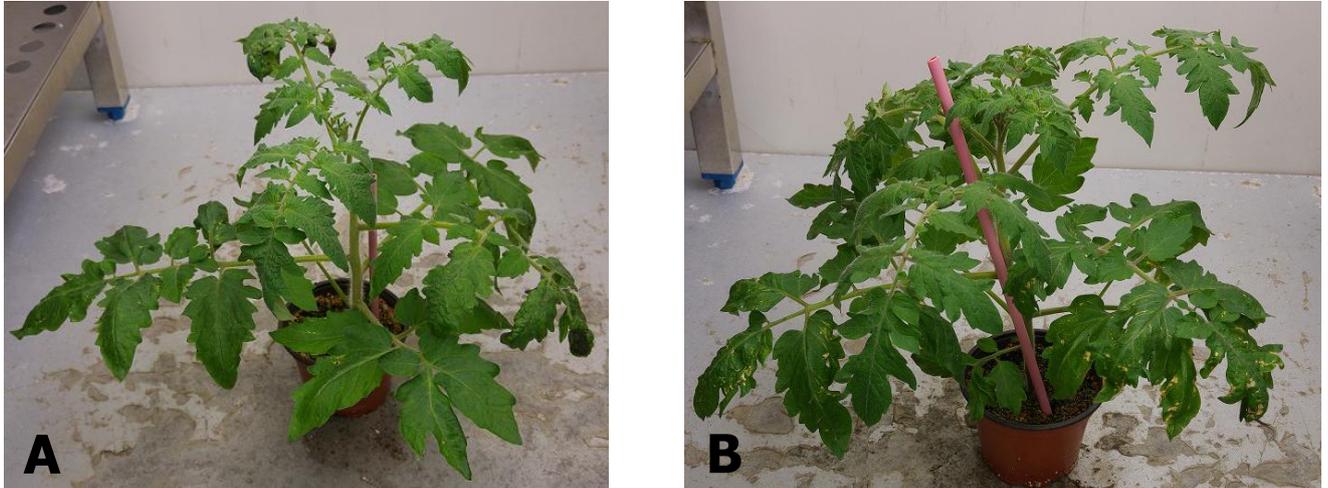
**Figura 20** – Niveles de expresión del gen *Tci21* en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* tratadas con escopoletina. Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Tci21* en explantes embebidos en disoluciones 0.5 mM de escopoletina. Se recogieron muestras a las 0, 1, 6 y 24 horas post-tratamiento. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1a)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar el tratamiento. La media y el error estándar mostrados corresponden a muestras independientes de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes para este compuesto.

Por lo tanto, tratamientos con este compuesto producen la inducción del gen *PR1* a las 24 horas después del tratamiento en plantas control, y del gen *Tci21* a las 6 horas después del tratamiento, tanto en plantas control como transgénicas, siendo la inducción mayor en éstas para *Tci21*. Estos resultados apoyan el posible papel de este compuesto en la respuesta defensiva de la planta. Para profundizar en esta hipótesis, nos propusimos analizar su presencia en plantas infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV), y sus posibles efectos sobre el desarrollo de la infección.

### 3.3. Tratamiento del inóculo con escopoletina

Debido a que las cumarinas se acumulan en las plantas cuando se produce una infección patogénica, se quiso comprobar si estos compuestos tenían actividad directa sobre el

organismo patógeno, en este caso, el virus del bronceado del tomate (TSWV). Para ello, plantas transgénicas Twi1 28.3 y 'MoneyMaker' fueron inoculadas con tampón que contenía el virus y al que se le había añadido escopoletina a una concentración final de 10 mM, tal y como se detalla en Materiales y Métodos.



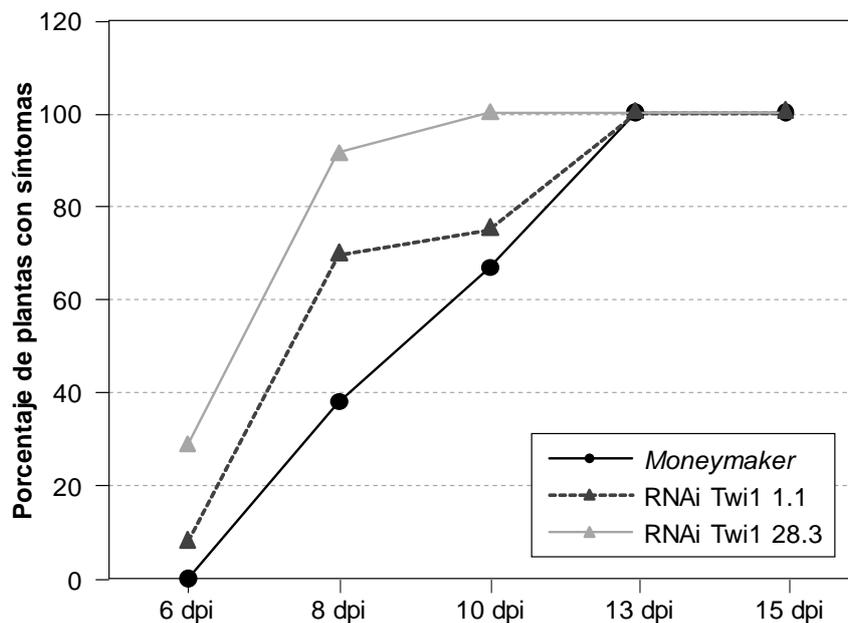
**Figura 21** – Imágenes de plantas pertenecientes al ensayo del virus del bronceado del tomate (TSWV). a) Planta *mock* tratada con inóculo sin virus b) Planta tratada con inóculo con virus y escopoletina.

Como se puede apreciar en la Figura 21, la sintomatología de una planta *mock* tratada únicamente con el tampón (A) se muestra similar a la de una planta tratada con el inóculo que contenía el virus más una pequeña cantidad de escopoletina (B). Esta diferencia en la sintomatología nos indica que este compuesto sí que afecta a la infección con el virus, ya que la planta presenta un aspecto similar al de una planta sana.

Estos resultados corroboran los obtenidos por Chong y colaboradores (2002) en donde trataron protoplastos de tabaco con escopoletina o con agua inmediatamente antes de su inoculación con TMV, sin afectar a su viabilidad. Se examinó la acumulación del RNA genómico de TMV 48 horas después de la inoculación, y se observó que el tratamiento con escopoletina había causado una reducción significativa en la acumulación del RNA viral en comparación con el tratamiento con agua.

### **3.4. Sintomatología**

Durante el periodo de infección, se anotaron los síntomas correspondientes a los 6, 8, 10, 13 y 15 días después de la segunda inoculación, valorando cada planta del 0 al 4 en función del grado de síntomas que se observan, tal y como se describe en Materiales y Métodos. La Figura 22 presenta el porcentaje de plantas infectadas que muestran síntomas para cada una de las líneas a lo largo del periodo de infección.

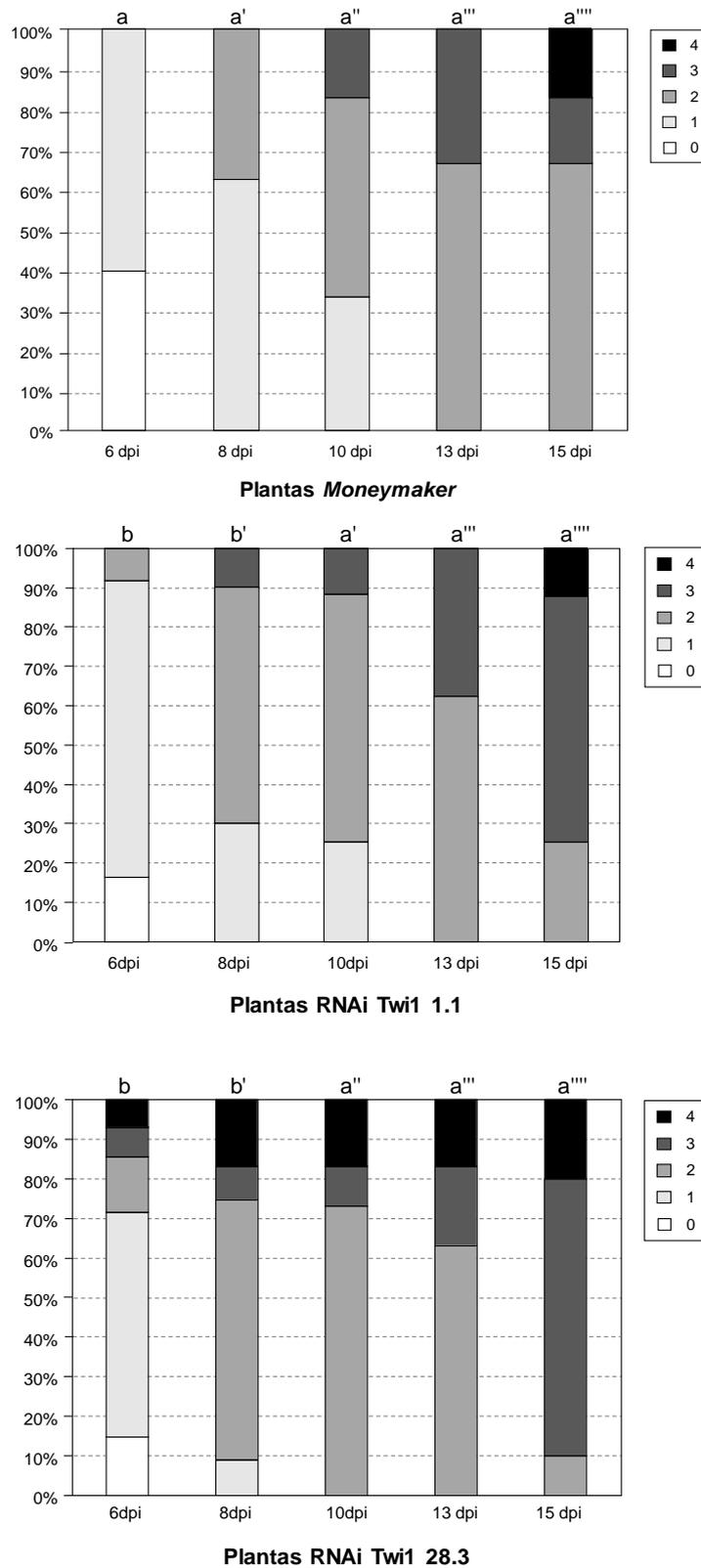


**Figura 22** – Porcentaje de plantas con síntomas en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). Se anotaron los síntomas a los 6, 8, 10, 13 y 15 días después de la segunda infección.

Estos resultados muestran una mayor susceptibilidad en las plantas transgénicas RNAi *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* frente al control. Se observa, especialmente, un mayor porcentaje de plantas con síntomas en la línea transgénica *Twi1 28.3*. Esto parece indicar que la ausencia de la expresión del gen *Twi1* provoca una menor resistencia a patógenos.

En la Figura 23 se muestra la evolución del daño ocasionado por la infección de TSWV en los folíolos de las plantas a lo largo de los 15 días de infección, confirmando una mayor susceptibilidad de las plantas *Twi1 28.3* y una mayor resistencia del control.

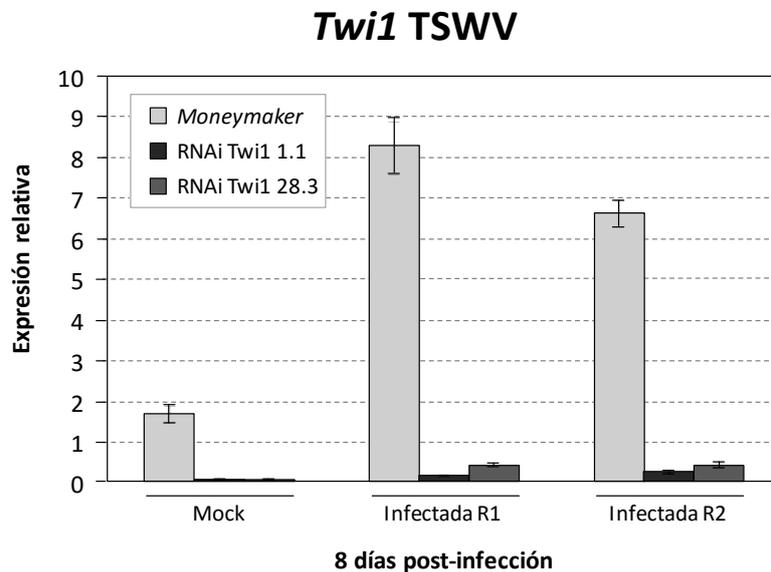
Los resultados indican que las plantas de la línea transgénica *Twi1 28.3* fueron más susceptibles a la infección, mostrando una mayor sintomatología desde la primera toma de muestras. La línea transgénica RNAi *Twi1 1.1* también presenta un mayor grado de síntomas respecto al control, aunque no de forma tan evidente como la línea *Twi1 28.3*.



**Figura 23** – Evolución del daño en folíolos de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). Un total de 14 plantas de cada tipo fueron infectadas mediante daño mecánico. Se muestra el porcentaje de plantas con el grado de síntomas en función del total de plantas de cada tipo a los 6, 8, 10, 13 y 15 días después de la segunda infección. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes. 0: no se observan síntomas, 1: peciolo horizontal, 2: peciolo caído y puntas de las hojas enrolladas, 3: peciolo casi vertical y folíolo enrollado, 4: peciolo completamente vertical y folíolo seco.

#### 4. Papel de *Twi1*: Inducción de *Twi1* en respuesta a la infección por virus *TSWV* en tomate

Con el fin de estudiar la expresión de *Twi1* en respuesta a una infección viral, se emplearon plantas 'Moneymaker' infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). La infección se realizó en plantas de un mes de edad mediante daño mecánico en tercera y cuarta hoja de la planta y posteriormente en la quinta y sexta hoja de la misma, tal y como se describe en Materiales y Métodos. A su vez, un 25% de las plantas fueron utilizadas como plantas *mock* de la infección aplicando el mismo tampón, pero sin añadir el inóculo viral. Se recogieron muestras a los 6, 8 y 15 días después de la segunda inoculación. Estas muestras fueron analizadas por RT-PCR cuantitativa para estudiar la inducción de *Twi1* a lo largo de la infección. Los resultados obtenidos a los 8 días post-infección se presentan en la Figura 24.



**Figura 24** – Niveles de expresión del gen *Twi1* en plantas de tomate 'Moneymaker' infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Twi1* en hojas de plantas infectadas mediante daño mecánico y plantas *mock* sin infectar, 8 días después de la segunda infección. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1a)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar la infección. La media y el error estándar mostrados corresponden a dos plantas de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes.

Se observa una fuerte inducción de *Twi1* en las plantas control como consecuencia de la infección con el virus del mosaico del tomate (TSWV), que produce una interacción compatible y que da lugar, por lo tanto, al desarrollo de la enfermedad en la planta. Esta inducción por virus es mucho mayor en comparación con la provocada en las plantas *mock*, probablemente debida a la herida producida como consecuencia de la técnica de inoculación empleada. Esto coincide con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en los que se observó inducción de *Twi1* en interacción compatible con la bacteria *Pseudomonas* en plantas de tomate Rio grande (Campos, 2014).

#### 4.1. Análisis estadístico

En la Tabla 5 se muestra el análisis estadístico de la infección con TSWV mediante el test de Kruskal-Wallis. Se observan diferencias significativas a los 6 y 8 días después de la inoculación atendiendo al grado de síntomas, entre las plantas control y las plantas RNAi Twi1, considerándose como el periodo post-inoculación más relevante.

**Tabla 5** – Parámetros estadísticos del test de Kruskal-Wallis para los índices de sintomatología de plantas MoneyMaker y plantas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 infectadas con TSWV.

Tiempo	Genotipo	N	Rango promedio	Chi-cuadrado	Grados de libertad	Valor de p
6 dpi	<i>MoneyMaker</i>	15	14,20	13,219	2	0,001
	Twi1 1.1	12	22,25			
	Twi1 28.3	15	28,20			
8 dpi	<i>MoneyMaker</i>	11	8,50	13,550	2	0,001
	Twi1 1.1	8	20,50			
	Twi1 28.3	11	18,86			
10 dpi	<i>MoneyMaker</i>	7	8,86	1,214	2	0,545
	Twi1 1.1	4	11,75			
	Twi1 28.3	7	8,86			
13 dpi	<i>MoneyMaker</i>	7	9,50	0,000	2	1,000
	Twi1 1.1	4	9,50			
	Twi1 28.3	7	9,50			
15 dpi	<i>MoneyMaker</i>	7	8,43	1,457	2	0,483
	Twi1 1.1	4	11,00			
	Twi1 28.3	7	9,71			

En la Tabla 6 se muestra el análisis estadístico, ateniendo al índice de infectividad, mediante el test de Mann-Whitney a los 6 y 8 días después de la infección. Se observan diferencias significativas al comparar plantas control con cada una de las transgénicas Twi1, pero no entre transgénicas, confirmando que el silenciamiento de la glucosiltransferasa Twi1 afecta al índice de infectividad de las plantas, y las hace más susceptibles a la infección viral.

**Tabla 6** – Parámetros estadísticos del test de Mann-Whitney para la infectividad de plantas *Moneymaker* y plantas *Tw1 1.1* (A), plantas control y plantas *Tw1 28.3* (B) y plantas *Tw1 1.1* y plantas *Tw1 28.3* (C) infectadas con TSWV.

**A**

Tiempo	Genotipo	N	Rango promedio	Valor de $p$
6 dpi	<i>Moneymaker</i>	15	11,70	0,044
	<i>Tw1 1.1</i>	12	16,88	
8 dpi	<i>Moneymaker</i>	11	6,91	0,002
	<i>Tw1 1.1</i>	8	14,25	

**B**

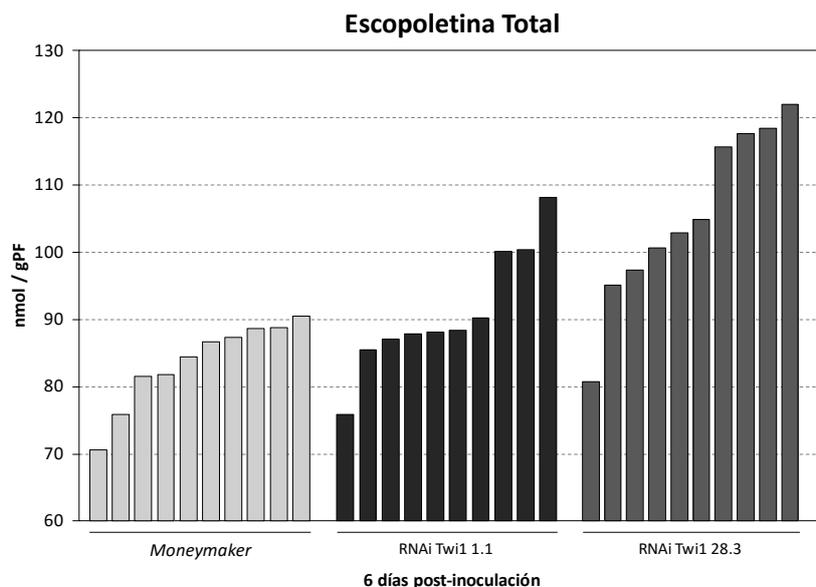
Tiempo	Genotipo	N	Rango promedio	Valor de $p$
6 dpi	<i>Moneymaker</i>	15	10,50	0,000
	<i>Tw1 28.3</i>	15	20,50	
8 dpi	<i>Moneymaker</i>	11	7,59	0,002
	<i>Tw1 28.3</i>	11	15,41	

**C**

Tiempo	Genotipo	N	Rango promedio	Valor de $p$
6 dpi	<i>Tw1 1.1</i>	12	11,88	0,101
	<i>Tw1 28.3</i>	15	15,70	
8 dpi	<i>Tw1 1.1</i>	8	10,75	0,563
	<i>Tw1 28.3</i>	11	9,45	

#### 4.2. Acumulación de escopoletina debido a la infección por TSWV

En la Figura 25 se exponen los resultados obtenidos referentes a la acumulación de escopoletina total en plantas de tomate infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se puede observar que las plantas transgénicas *Tw1* muestran una mayor acumulación de escopoletina en comparación con el control.

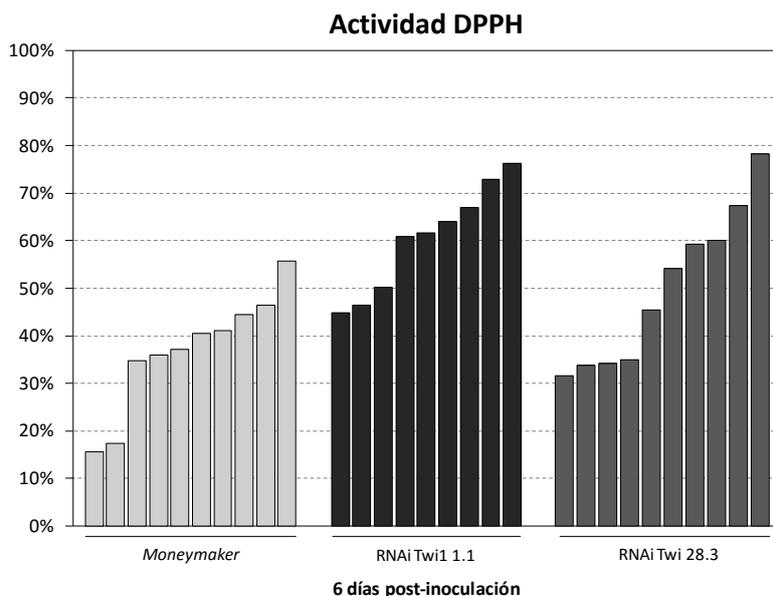


**Figura 25** – Niveles de acumulación de escopoletina total en plantas de tomate 'Moneymaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). Se analizó por HPLC la acumulación de escopoletina total en hojas de plantas infectadas mediante daño mecánico, 6 días después de la segunda infección.

Estos resultados contrastan con la sintomatología, puesto que las plantas transgénicas resultaron ser más susceptibles a la infección a pesar de acumular una mayor cantidad de escopoletina. Sin embargo, estos resultados coinciden con los obtenidos en un estudio desarrollado por Gachon y colaboradores (2004), donde se observó que la sobreexpresión de TOGT en tabaco, una glicosiltransferasa homóloga a *Twi1*, provocaba un aumento de la concentración de escopoletina y escopolina en plantas transgénicas después de la inoculación con el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), en comparación con las plantas control. A pesar de observarse una mayor acumulación de estos compuestos, las plantas transgénicas mostraron lesiones necróticas de forma más temprana y con una mayor velocidad de desarrollo.

Estos mismos autores proponen que la mayor susceptibilidad es debida a que la escopoletina, aunque tiene un efecto protector a bajas concentraciones, puede tener efectos tóxicos si se acumula a altas concentraciones, por lo que esta sintomatología observada podría deberse a esta mayor acumulación de escopoletina.

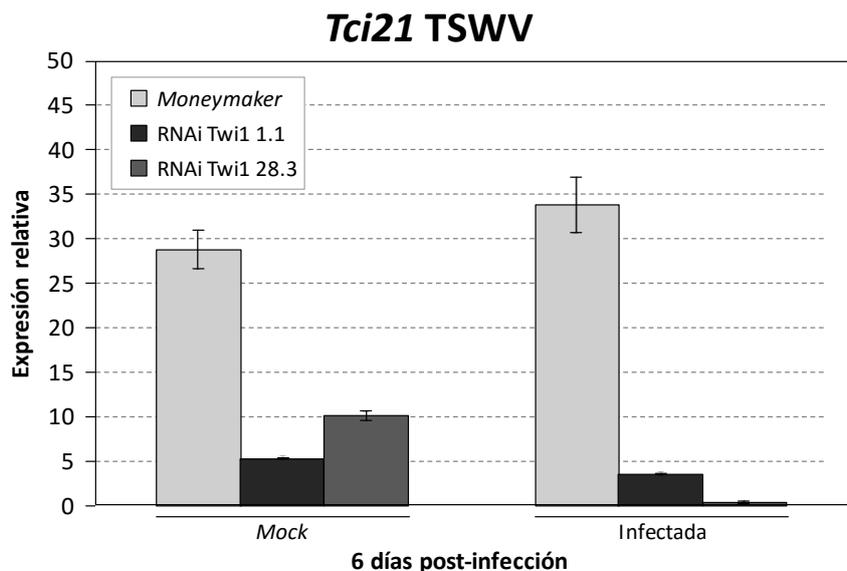
Debido a esto, se midió el poder antioxidante de las muestras de plantas infectadas con el virus del bronceado del tomate, y se observó que las plantas transgénicas RNAi *Twi1* presentaban mayor capacidad antioxidante con respecto a las plantas Moneymaker (Figura 26).



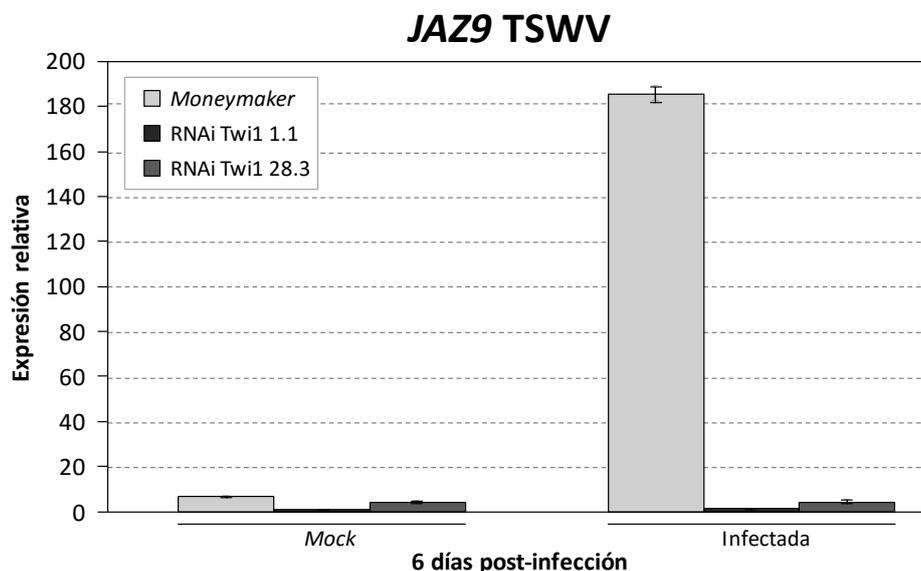
**Figura 26** – Medición del poder antioxidante de extractos de plantas de tomate 'MoneyMaker' como control y transgénicas *Twi1 1.1* y *Twi1 28.3* infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV) tomadas a los 6 días después de la inoculación.

Chong y colaboradores, en un proyecto llevado a cabo en 2002, mostraron que el silenciamiento de la glicosiltransferasa TOGT, suprimía la acumulación de escopolina entre un 70 y un 75% en plantas de tabaco, lo que provoca una reacción hipersensible a TMV. En relación con los resultados obtenidos en nuestro ensayo, esto podría significar que, al no producirse la conjugación de escopoletina, los niveles de escopolina en las plantas transgénicas son menores que los presentes en las plantas control, por lo que acaban siendo más susceptibles. Por lo tanto, la escopoletina debería encontrarse en forma glucoconjugada en planta para poder colaborar a la resistencia a la infección de plantas de tabaco con TMV.

Por ello, decidimos estudiar si estos niveles alterados de escopoletina que se han detectado en las plantas transgénicas RNAi *Twi1* podían estar afectando a la expresión de genes relacionados con defensa. Para ello, se cuantificó el nivel de expresión de los genes *Tci21*, gen marcador de la respuesta a ácido jasmónico (JA), y *JAZ9*, gen involucrado en la señalización de JA. Como se puede ver en las Figuras 27 y 28, se observó que ambos genes se inducen fuertemente en las plantas 'MoneyMaker', en comparación con las plantas transgénicas.



**Figura 27** – Niveles de expresión del gen *Tci21* en plantas de tomate 'Moneymaker' infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Tci21* en hojas de plantas infectadas mediante daño mecánico y plantas mock sin infectar, 6 días después de la segunda infección. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1a)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar la infección. La media y el error estándar mostrados corresponden a dos plantas de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes.



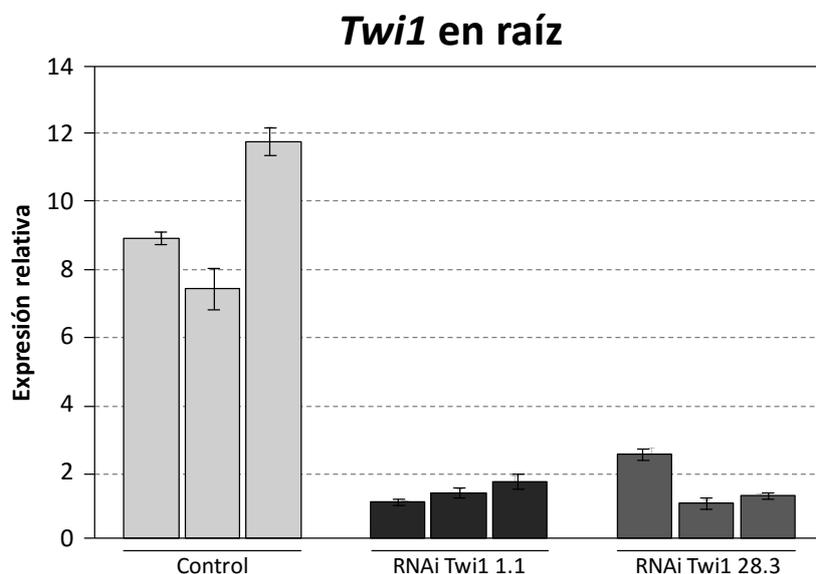
**Figura 28** – Niveles de expresión del gen *Jaz9* en plantas de tomate 'Moneymaker' infectadas con el virus del bronceado del tomate (TSWV). Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Jaz9* en hojas de plantas infectadas mediante daño mecánico y plantas mock sin infectar, 6 días después de la segunda infección. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha (eEF1a)*, tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las plantas antes de iniciar la infección. La media y el error estándar mostrados corresponden a dos plantas de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que los mayores niveles de acumulación de escopoletina en las plantas transgénicas RNAi Twi1 podrían estar afectando los niveles de JA en planta.

De hecho, en un artículo publicado en 2014 por Sun y colaboradores, se infectaron plantas de tabaco con silenciamiento de genes implicados en la biosíntesis y respuesta a JA con el hongo *Alternaria alternata*. En primer lugar, se observó que esta infección fúngica provocaba un aumento de JA en hojas jóvenes infectadas de plantas *wild type* (WT), siendo menor en hojas maduras, así como una acumulación de escopoletina. Sin embargo, no se detectaba acumulación de escopoletina en las plantas deficientes en JA, mostrando una mayor susceptibilidad a la infección. Estos autores pusieron de manifiesto la estrecha relación existente entre la acumulación de escopoletina y los niveles de JA en planta, ya que al aplicar un tratamiento de metil jasmonato, se restauraron los niveles de escopoletina. Sería interesante, por tanto, realizar medidas de JA en las plantas transgénicas RNAi Twi1 infectadas con el virus del bronceado del tomate, puesto que recientemente se ha observado que existe relación entre los niveles de JA y la resistencia a infecciones virales en arroz (Zhang *et al.* 2016).

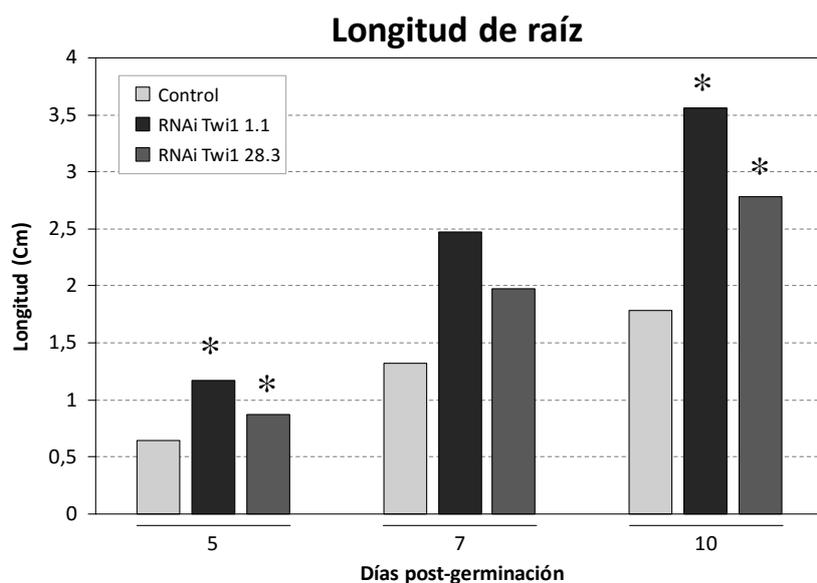
## 5. Fenotipo de las raíces de las plantas RNAi Twi1

Diversos autores han descrito la acumulación de escopoletina en raíz (Buschmann *et al.*, 2000; Bednarek *et al.*, 2005; Kai *et al.* 2006), por lo que se decidió estudiar el fenotipo de este órgano en las plantas transgénicas RNAi Twi1. En la Figura 29 se observa la expresión de *Twi1* en raíces de plantas control, mientras que se mantiene silenciado en las plantas transgénicas.



**Figura 29** – Niveles de expresión del gen *Twi1* en raíces de plantas de tomate 'MoneyMaker' y plantas transgénicas *Twi1*. Se analizó por RT-PCR cuantitativa la acumulación de mRNA de *Twi1* en raíces de plantas tomadas a los 10 días después de la germinación. Los valores obtenidos fueron normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Elongation Factor 1 alpha* (*eEF1a*), tomando como valor de referencia 1 la cantidad de mRNA de las raíces con menor expresión. La media y el error estándar mostrados corresponden a tres repeticiones de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes.

Al realizar estos estudios encontramos un hallazgo sorprendente: las raíces de las plantas RNAi Twi1 parecían mostrar un mayor desarrollo que las parentales. Para corroborarlo, se hicieron crecer plantas control 'Moneymaker' y transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 en vermiculita, midiéndose la longitud de la raíz diferentes tiempos, tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Se observó, de manera general, que la raíz creció de manera significativamente más rápida en las plantas transgénicas frente al control (Figura 30).



**Figura 30** – Longitud de raíces procedentes de plantas *Moneymaker* y plantas transgénicas *Twi1* medidas a los 5, 7 y 10 días después de la germinación.

Debido a los resultados obtenidos en esta primera aproximación, será interesante conocer los niveles de acumulación de escopoletina en estas raíces que presentan tal desarrollo diferencial (Figura 31). A priori, cabría esperar una mayor acumulación de escopoletina en plantas RNAi Twi1, al igual que se ha observado en hojas de plantas infectadas, respecto a plantas control. Esta mayor acumulación de escopoletina podría estar relacionada de algún modo con un mayor crecimiento de la raíz, por ejemplo, afectando a los niveles de auxinas, como el ácido indolacético, en la raíz de las plantas transgénicas RNAi Twi1.

Se ha descrito que las cumarinas influye en la morfología e histología de la raíz de maíz y *Arabidopsis*, (Svensson 1971, 1972; Kupidowska *et al.*, 1994; Abenavoli *et al.*, 2001), inhibiendo el alargamiento primario de la raíz y estimulando la formación de raíces laterales (Abenavoli *et al.*, 2004, 2008; Lupini *et al.*, 2014). En 2010, Lupini y colaboradores identificaron la zona de la raíz perteneciente a los primeros 20 mm desde la punta, como la parte más sensible a cumarinas, sugiriendo que este efecto podría ser mediado por las auxinas. Probablemente, existe una red compleja de señalización molecular que regula las respuestas fisiológicas producidas por las cumarinas, donde el transporte y/o la biosíntesis de auxinas podría desempeñar un papel importante (Lupini *et al.*, 2014).



**Raíces Control**



**Raíces RNAi Twi1 1.1**



**Raíces RNAi Twi1 28.3**

**Figura 31** – Comparación de la longitud de raíces procedentes de plantas Moneymaker a modo de control y plantas transgénicas RNAi Twi1 de un mes de edad.

*Conclusiones*

---

## CONCLUSIONES

1. La proteína purificada Twi1 muestra actividad *in vitro* con las cumarinas escopoletina, umbeliferona y esculetina, así como con los fenólicos simples 2,4-DHBA y 2,4,6-THBA.
2. La enzima  $\beta$ -glucosidasa provoca la ruptura del enlace glicosídico presente en la escopolina, liberando escopoletina. El enlace formado por Twi1 entre glucosa y escopoletina es, por tanto, un enlace beta glicosídico.
3. La aplicación exógena de escopoletina, umbeliferona y esculetina provoca la inducción del gen *Twi1*.
4. Tras la aplicación exógena de escopoletina, umbeliferona y esculetina, las plantas transgénicas que silencian *Twi1* mostraron un menor nivel de inducción del gen de defensa *PR1*. Sin embargo, aumentó la inducción del gen *TCI21*, frente a las plantas control 'MoneyMaker'.
5. Las plantas transgénicas que silencian *Twi1* mostraron mayor acumulación de escopoletina y umbeliferona en tratamientos con estos compuestos, respecto a las plantas control 'MoneyMaker'.
6. La infección con el virus del bronceado del tomate (TSWV) causa la inducción de *Twi1* en plantas de tomate.
7. La infección con TSWV ocasiona aumento de la acumulación de escopoletina en las plantas transgénicas que silencian *Twi1* frente al control 'MoneyMaker'.
8. Las plantas transgénicas Twi1 1.1 y Twi1 28.3 de tomate muestran una acusada susceptibilidad a TSWV, siendo dicha susceptibilidad mucho más pronunciada en las plantas transgénicas Twi1 28.3. Esta susceptibilidad está correlacionada con los mayores niveles de escopoletina presentes en la planta.
9. La adición de escopoletina al inóculo viral de TSWV previo a la inoculación (15 minutos antes) provoca una reducción en la infectividad del virus.
10. Las plantas de tomate que silencian *Twi1* exhiben un mayor crecimiento de sus raíces en comparación con el parental 'MoneyMaker'.

## *Bibliografía*

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- ABENAVOLI M. R., DE SANTIS C., SIDARI M., SORGONÀ A., BDIANI M., CACCO G. (2001). *Influence of coumarin on the net nitrate uptake in durum wheat*. *New Phytol* 150: 619–627.
- ABENAVOLI M. R., NICOLÒ A., LUPINI A., OLIVA S., SORGONÀ A. (2008). *Effects of different allelochemicals on root morphology of Arabidopsis thaliana*. *Allelopathy J* 22: 245–252.
- ABENAVOLI M. R., SORGONÀ A., ALBANO S., CACCO G. (2004). *Coumarin differentially affects the morphology of different root types of maize seedlings*. *J Chem Ecol* 30: 1871–1883.
- ACHARD P., VRIEZEN W. H., VAN DER STRAETEN D., HARBERD N. P. (2003). *Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function*. *Plant Cell* 15: 2816–2825.
- AHL GOY P., SIGNER H., REIST R., AICHHOLZ R., BLUM W., SCHMIDT E., KESSMANN H. (1993). *Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid Nicotiana glutinosa x Nicotiana debneyi*. *Planta* 191: 200–206. DOI: 10.1007/BF00199750.
- AMIL-RUIZ F., GARRIDO-GALA J., GADEA J., BLANCO-PORTALES R., MUÑOZ-MÉRID A., TRELLES O., DE LOS SANTOS B., ARROYO F. T., AGUADO-PUIG A., ROMERO F., MERCADO J. A., PLIEGO-ALFARO F., MUÑOZ-BLANCO J., CABALLERO J. L. (2016). *Partial Activation of SA- and JA- Defensive Pathways in Strawberry upon Colletotrichum acutatum Interaction*. *Frontiers in Plant Science* 7. DOI: 10.3389/fpls.2016.01036.
- ANDREAE W. A. (1948). *The isolation of a blue fluorescent compound scopoletin, from Green Mountain potato tubers, infected with leaf roll virus*. *Can. J. Res.* 26(1): 31–34.
- ASSELBERGH B., CURVERS K., FRANCA S. C., AUDENAERT K., VUYLSTEKE M. *et al.* (2007). *Resistance to Botrytis cinerea in sitiens, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell Wall modifications in the epidermis*. *Plant Physiol.* 144: 1863–77.
- BARCELLONA D., VANNINI M. L., FENU L., BALESTRIERI C., MARONGIU F. (2008). *Warfarin or acenocoumarol: which is better in the management of oral anticoagulants?* *Thromb Haemost.* 100(6): 1052–1057.
- BECKERS G. J., SPOEL S. H. (2006). *Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate*. *Plant Biol.* 8(1): 1–10.
- BEDNAREK P., SCHNEIDER B., SVATOS A., OLDHAM N., HAHLBROCK K. (2005). *Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots*. *Plant Physiol* 138: 1058–1070.
- 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 defences in tomato*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12(3): 227–235.
- BOLLER T., FELIX G. (2009). *A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 379–406.
- BORGES F., ROLEIRA F., MILHAZES N., SANTANA L., URIARTE E. (2005). *Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity*. *Curr. Med. Chem.* 12(8): 887–916. DOI: 10.2174/0929867053507315.
- BORGES F., ROLEIRA F., MILHAZES N., URIARTE E., SANTANA L. (2009). *Simple coumarins: Privileged scaffolds in medicinal chemistry*. *Front. Med. Chem. Biol. Inter.* 4: 23–85. DOI: 10.2174/978160805207310904010023.

- BOURGAUD F., HEHN A., LARBAT R., DOERPER S., GONTIER E., KELLNER S., MATERN U. (2006). *Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes*. *Phytochem. Rev* 5: 293-308. DOI: 10.1007/s11101-006-9040-2.
- BRAVO L. (1998). *Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. *Nutr Rev.* 56: 317-333. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x.
- 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)*. *Ann. Bot.* 86: 1153-1160.
- 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)*. *Ann. Bot.* 86: 1153-1160.
- CAMPOS L. (2014). *Metabolitos secundarios de naturaleza fenólica: papel en la respuesta defensiva de plantas de tomate*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- 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.
- CHEYNIER V., COMTE G., DAVIES K. M., LATTANZIO V., MARTENS S. (2013). *Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology*. *Plant Physiol. Biochem.* 72: 1-20. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
- CHOI J., HUH S. U., KOKIMA M., SAKAKIBARA H., PAEK K. H., HWANG I. (2010). *The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis*. *Dev. Cell* 19: 284-295.
- CHONG J., BALTZ R., FRITIG B., SAINDRENAN P. (1999). *An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism*. *FEBS Lett.* 458: 204-208.
- CHONG J., BALTZ R., SCHMITT C., BEFFA R., FRITIG B., SAINDRENAN P. (2002). *Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance*. *Plant Cell.* 14: 1093-1107. DOI: 10.1105/tpc.010436.
- COSTET L., CORDELIER S., DOREY S., BAILLIEU F., FRITIG B., KAUFFMANN S., (1999). *Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR*. *Mol. Plant-Microbe Interact* 12: 655-662.
- COSTET L., FRITIG B., KAUFFMANN S. (2002). *Scopoletin expression in elicitor-treated and tobacco mosaic virus-infected tobacco plants*. *Physiol. Plant* 115(2): 228-235.
- DANGL J. L., JONES J. D. G. (2001). *Plant pathogens and integrated defence responses to infection*. *Nature* 411: 826-833.
- DEAN J. V., MOHAMMED L. A., FITZPATRICK T. (2005). *The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures*. *Planta* 221: 287-296.
- DELANEY T. P. (1997). *Genetic dissection of acquired resistance to disease*. *Plant Physiol.* 113: 5-12.
- DELANEY T. P. *et al.* (1994). *A central role of salicylic acid in plant disease resistance*. *Science* 266: 1247-1250.
- DIXON R. A. (2001). *Natural products and plant disease resistance*. *Nature* 411: 843-847.
- DODDS P. N., RATHJEN J. P. (2010). *Towards an integrated view of plant-pathogen interactions*. *Nat. Rev. Genet.* 11: 539-548.

- DOREY S., BAILLIEUL F., PIERREL M. A., SAINDRENAN P., FRITIG B., KAUFFMANN S. (1997). *Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of Salicylic Acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor*. Mol. Plant Microbe Inter. 10: 646-655. DOI: 10.1094/MPMI.1997.10.5.646.
- DRÖGE-LASER, W. *et al.* (1997). *Rapid stimulation of a soybean protein serine-threonine kinase which phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses*. EMBO J. 16: 726-738.
- EL MODAFAR C., CLERIVET A., FLEURIET A., MACHEIX J. J. (1993). *Inoculation of Platanus Acerifolia with Ceratocystis Fimbriata F. Sp. Platani Induces Scopoletin and Umbelliferone Accumulation*. Phytochemistry 34(5): 1271-1276.
- FLOR H. H. (1971). *Current status of the gene-for-gene concept*. Annu. Rev. Phytopathol. 9: 275-296.
- FRAISSINET-TACHET L., BALTZ R., CHONG J., KAUFFMANN S., FRITIG B., SAINDRENAN P. (1998). *Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid*. FEBS Lett. 437(3): 319-323.
- GACHON C., BALTZ R., SAINDRENAN P. (2004). *Over-expression of a scopoletin glucosyltransferase in Nicotiana tabacum leads to precocious lesion formation during the hypersensitive response to tobacco mosaic virus but does not affect virus resistance*. Plant Molecular Biology 54: 137-146.
- GACHON C.M., LANGLOIS-MEURINNE M., SAINDRENAN P., P. (2005). *Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis*. Trends Plant Sci. 10: 542-549.
- GARCIA-BRUGGER A., LAMOTTE O., VANDELLE E., BOURQUE S., LECOURIEUX D., POINSSOT B., WENDEHENNE D., PUGIN A. (2006). *Early signaling events induced by elicitors of plant defenses*. Mol. Plant-Microbe Interact. 19: 711-724.
- GIESEMANN A., BIEHL B., LEIBEREI R. (2008). *Identification of scopoletin as a phytoalexin of the rubber tree Hevea brasiliensis*. J. Phytopathol. 117: 373-376.
- GRANT M., LAMB C. (2006). *Systemic immunity*. Curr. Opin. Plant Biol. 9: 414-420.
- GU Y. Q., YANG C., THARA V. K., ZHOU J., MARTIN G. B. (2000). *Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase*. Plant Cell 12(5): 771-786.
- HANS J., BRANDT W., VOGT T. (2004). *Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from Dorotheanthus bellidiformis*. Plant J. 39(3): 319-333.
- HEATH M. C. (2000a). *Nonhost resistance and nonspecific plant defenses*. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 315-319.
- HEATH M. C. (2000b). *Hypersensitive response-related death*. Plant Mol. Biol. 44: 321-334.
- HIRADE Y., KOTOKU N., TERASAKA K., SAIJO-HAMANO Y., FUKUMOTO A., MIZUKAMI H. (2015). *Identification and functional analysis of 2-hydroxyflavanone C-glucosyltransferase in soybean (Glycine max)*. FEBS Letters 589: 1778-1786. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.010.
- HOLBEIN J., GRUNDLER F. M., SIDDIQUE S. (2016). *Plant basal resistance to nematodes: an update*. J. Exp. Bot. 67: 2049-2061. DOI: 10.1093/jxb/erw005.
- ISHIGA Y., ISHIGA T., UPPALAPATI S. R., MYSORE K. S. (2013). *Jasmonate ZIM-Domain (JAZ) Protein Regulates Host and Nonhost Pathogen-Induced Cell Death in Tomato and Nicotiana benthamiana*. Plos One 8 (9): e75728. DOI: 10.1371/journal.pone.0075728.

- ISHIHARA H., TOHGE T., VIEHOVER P., FERNIE A. R., WEISSHAAR B., STRACKE R. (2016). *Natural variation in flavonol accumulation in Arabidopsis is determined by the flavonol glucosyltransferase BGLU6*. J. Exp. Bot. 67: 1505-1517. DOI: 10.1093/jxb/erv546.
- JACKSON R. G., LIM E. K., LI Y., KOWALCZYK M., SANDBERG G., HOGGETT J., ASHFORD D. A., BOWLES D. J. (2001). *Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase*. The Journal of Biological Chemistry 276(6): 4350-4356. DOI: 10.1074/jbc.M006185200.
- JACKSON R., KNISLEY D., MCINTOSH C., PFEIFFER P. (2011). *Predicting Flavonoid UGT Regioselectivity*. Adv. Bioinform. 2011: 506583. DOI: 10.1155/2011/506583.
- JAGANATH I. B., CROZIER A. (2010). *Dietary flavonoids and phenolic compounds*. In: Fraga C.G.), editor. Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. pp: 1-49.
- JEANDET P., CLÉMENT C., COUROT E., CORDELIER S. (2013). *Modulation of Phytoalexin Biosynthesis in Engineered Plants for Disease Resistance*. Int. J. Mol. Sci. 14: 14136-14170. DOI: 10.3390/ijms140714136.
- JONES J. D. G., DANGL J. (2006). *The plant immune system*. Nature 444: 323-329.
- KACHROO A., ROBIN G. P. (2013). *Systemic signaling during plant defence*. Curr. Opin. Plant Biol. 16(4): 527-533.
- KAI K., SHIMIZU B., MIZUTANI M., WATANABE K., SAKATA K. (2006). *Accumulation of coumarins in Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 67: 379-386. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.11.006.
- KINDL H. (1971). *Ortho-hydroxylation of aromatic carboxylic acids in higher plants*. Hoppe Seylers Z Physiol. Chem. 352: 78-84.
- KUBO A., ARAI Y., NAGASHIMA S., YOSHIKAWA T. (2004). *Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation*. Arch. Biochem. Biophys. 429: 198-203.
- KUPIDLÓWSKA E., KOWALEC M., SULKOWSKI G., ZOBEL A. M. (1994). *The effect of coumarins on root elongation and ultrastructure of meristematic cell protoplast*. Ann Bot 73: 525-530.
- KUROSAWA Y., TAKAHARA H., SHIRAIWA M. (2002). *UDP-glucuronic acid: soyasapogenol glucuronosyltransferase involved in saponin biosynthesis in germinating soybean seeds*. Planta 215(4): 620-629.
- LAM E., KATO N., LAWTON M. (2001). *Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response*. Nature 411: 848-853.
- LE ROY J., HUSS B., CREACH A., HAWKINS S., NEUTELINGS G. (2016). *Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biologican Activity in Plants*. Frontiers in Plant Science 7 (735). DOI: 10.3389/fpls.2016.00735.
- LEE B., KIM S., CHOI S. B., BAE J., KIM K., KIM Y., PAEK K. (2009). *Pathogen-inducible CaUGT1 is involved in resistance response against TMV infection by controlling salicylic acid accumulation*. FEBS Letters 583: 2315-2320. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.06.028.
- LEE H. I., RASKIN I. (1999). *Purification, cloning and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco*. The Journal of Biological Chemistry 274 (51): 36637-36642. DOI: 10.1074/jbc.274.51.36637.
- LI X., SVEDIN E., MO H., ATWELL S., DILKES B. P., CHAPPLE C. (2014). *Exploiting Natural Variation of Secondary Metabolism Identifies a Gene Controlling the Glycosulation Diversity of Dihydroxybenzoic Acids in Arabidopsis thaliana*. Genetics. PII: genetics.114.168690.
- LIM E. K., BOWLES D. J. (2004). *A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis*. EMBO J. 23: 2915-2922.

- LIM E. K., HIGGINS G. S., LI Y., BOWLES D. J. (2003). *Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained in planta*. *Biochem. J.* 373: 987-992. DOI: 10.1042/bj20021453.
- 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): e0166938. doi: 10.1371/journal.pone.0166938
- LUPINI A., ARANITI F., SUNSERI F., ABENAVOLI M. R. (2014). *Coumarin interacts with auxin polar transport to modify root system architecture in Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 74: 23-31. DOI: 10.1007/s10725-014-9893-0.
- LUPINI A., SORGONÀ A., MILLER A. J., ABENAVOLI M. R. (2010). *Short-time effects of coumarin along the maize primary root axis*. *Plant Signal Behav* 5: 1395-1400.
- MACKENZIE P. I., OWENS I. S., BURCHELL B., BOCK K. W., BAIROCH A., BELANGER A., et al. (1997). *The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update base on evolutionary divergence*. *Pharmacogenetics*. 7: 255-269.
- MATOS M. J., SANTANA L., URIARTE E., ABREU O. A., MOLINA E., YORDI E. G. (2015). *Coumarins – An Important Class of Phytochemicals*. *Phytochemicals – Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, Chapter 5: 113-140. DOI: 10.5772/59982.
- MELCHERS L. S., STUIVER M. H. (2000). *Novel genes for disease-resistance breeding*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 147-152.
- MIERZIAK J., KOSTYN K., KULMA A. (2014). *Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment*. *Molecules* 19: 16240-16265. DOI: 10.3390/molecules191016240.
- MOEHS C. P., ALLEN P. V., FRIEDMAN M., BELKNAP W. R. (1997). *Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato*. *Plant J.* 11: 227-236.
- MOREL J. B., DANGL J. K. (1997). *The hypersensitive response and the induction of cell death in plants*. *Cell Death Differ.* 4: 671-683.
- NAKAGAWA T., SUZUKI T., MURATA S., NAKAMURA S., HINO T., MAEO K., TABATA R., KAWAI T., TANAKA K., NIWA Y., WATANABE Y., NAKAMURA K. (2007). *Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(8): 2095-2100.
- NARANJO M. A., ROMERO C., BELLÉS J. M., MONTESINOS C., VICENTE O., SERRANO R. (2003). *Lithium treatment induces a hypersensitive-like response in tobacco*. *Planta* 217: 417-424. DOI: 10.1007/s00425-003-1017-4
- NAVARRO L., DUNOYER P., JAY F., ARNOLD B., DHARMASIRI N. et al. (2006). *A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling*. *Science* 312: 436-439.
- NEWMANN M. A., SUNDELIN T., NIELSEN J. Y., ERBS G. (2013). *MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants*. *Front. Plant Sci.* 4: 139.
- O'DONNELL P. J., TRUESDALE M. R., CALVERT C. M., DORANS A., ROBERTS M. R., BOWLES D. J. (1998). *A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals*. *Plant J.* 14: 137-142.
- PIETERSE C. M., VAN LOON L. C. (1999). *Salicylic acid-independent plant defence pathways*. *Trends Plant Sci.* 4: 52-58.
- PITZSCHKE A., SCHIKORA A., HIRT H. (2009). *MAPK cascade signaling networks in plant defence*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 421-426.
- PUSZTAHELYI T., HOLB I. J., POCSI I. (2015). *Secondary metabolites in fungus-plant interactions*. *Front. Plant Sci.* 6: 573. DOI: 10.3389/fpls.2015.00573.

- ROBERT-SEILANIANTZ A., GRANT M., JONES J. D. G. (2011). *Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism*. Annu. Rev. Phytopathol. 49: 317-343. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114447.
- ROBERT-SEILANIANTZ A., NAVARRO L., BARI R., JONES J. D. (2007). *Pathological hormone imbalances*. Curr. Opin. Plant Biol. 10: 372-379.
- RYALS J. A., NEUENSCHWANDER U. H., WILLITS M. G., MOLINA A., STEINER H. Y., HUNT M. D. (1996). *Systemic acquired resistance*. Plant Cell 8: 1809-1819.
- SAEMA S., RAHMAN L. U., SINGH R., NIRANJAN A., AHMAD I. Z., MISRA P. (2015). *Ectopic overexpression of WsSGTL1, a sterol glucosyltransferase gene in Withania somnifera, promotes growth, enhances glycowithanolide and provides tolerance to abiotic and biotic stresses*. Plant Cell Rep. DOI: 10.1007/s00299-015-1879-5.
- SCHEEL D. (1998). *Resistance response physiology and signal transduction*. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 305-310.
- SETO Y., HAMADA S., MATSUURA H., MATSUSHIGE M., SATOU C., TAKAHASHI K., MASUTA C., ITO H., MATSUI H., NABETA. (2009). *Purification and cDNA cloning of a wound inducible glucosyltransferase active toward 12-hydroxy jasmonic acid*. Phytochemistry 70(3): 370-379. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.01.004.
- SHEYN U., ROSENWASSER S., BEN-DOR S., PORAT Z., VARDI A. (2016). *Modulation of host ROS metabolism is essential for viral infection of a bloom-forming coccolithophore in the ocean*. The ISME Journal 10: 1742-1754.
- SIMKOVITCH R., HUPPERT D. (2015a). *Excited-State Proton Transfer in Resveratrol and Proposed Mechanism for Plant Resistance to Fungal Infection*. J. Phys. Chem. B. 119: 11684-11694.
- SIMKOVITCH R., HUPPERT D. (2015b). *Photoprotolytic Processes of Umbelliferone and Proposed Function in Resistance to Fungal Infection*. J. Phys. Chem. B. 119: 14683-14696. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b08439.
- SIMON C., LANGLOIS-MEURINNE M., DIDIERLAURENT L., CHAOUCH S., BELLVERT F., MASSOUD K., et al. (2014). *The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are components of redox status in resistance of Arabidopsis to Pseudomonas syringae pv. tomato*. Plant Cell Environ. 37: 1114-1129. DOI: 10.1111/pce.12221.
- SINGH G., TIWARI M., SINGH S. P., SINGH S., TRIVEDI P. K., MISRA P. (2016). *Silencing of sterol glycosyltransferases modulates the withanolide biosynthesis and leads to compromised basal immunity of Withania somnifera*. Scientific Reports 6: 25562. DOI: 10.1038/srep25562.
- SIWINSKA J., KADZINSKI L., BANASIUK R., GWIZDEK-WISNIEWSKA A., OLRZY A., BANECKI B., LOJKOWSKA E., IHNATOWICZ A. (2014). *Identification of QTLs affecting scopolin and scopoletin biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biology 14: 280. DOI: 10.1186/s12870-014-0280-9.
- SONG J. T., KOO Y. J., SEO H. S., KIM M. C., CHOI Y. D., KIM J. H. (2008). *Overexpression of AtSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to Pseudomonas syringae*. Phytochemistry 69: 1128-1134. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.12.010.
- SPENCER J., ABD EL MOHSEN M., MINIHAANE A., MATHERS J. (2008). *Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research*. British Journal of Nutrition. 99(01): 12-22. DOI: 10.1017/S0007114507798938.
- STUIVER M.H., CUSTERS J. H. H. V. (2001). *Engineering disease resistance in plants*. Nature 411: 865-868.
- SUN H., WANG L., ZHANG B., MA J., HETTENHAUSEN C., CAO G., SUN G., WU J., WU J. (2014). *Scopoletin is a phytoalexin against Alternaria alternate in wild tobacco dependent on*

- jasmonate signalling*. Journal of Experimental Botany. 65 (15): 4305-4315. DOI: 10.1093/jxb/eru203.
- SVENSSON S. B. (1971). *The Effect of coumarin on root growth and root histology*. Physiol Plant 24: 446-470.
- SVENSSON S. B. (1972). *The effect of coumarin on growth, production of dry matter, protein and nucleic acids in roots of maize and wheat and the interactions of coumarin with metabolic inhibitors*. Physiol Plant 27: 13-24.
- TAGUCHI G., FUJIKAWA S., YAZAWA T., KODAIRA R., HAYASHIDA N., SHIMOSAKA M., OKAZAKI M. (2000a). *Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells*. Plant Sci. 151: 153-161.
- TAGUCHI G., IMURA H., MAEDA Y., KODAIRA R., HAYASHIDA N., SHIMOSAKA M., OKAZAKI M. (2000b). *Purification and characterization of UDP-glucose: hydroxycoumarin 7-O-glucosyltransferase, with broad substrate specificity from tobacco cultured cells*. Plant Science 157: 105-112. PII: S0168-9452(00)00270-3.
- TAL B., ROBESON D. J. (1986). *The metabolism of sunflower phytoalexins ayapin and scopoletin: plant-fungus interactions*. Plant Physiol 82(1): 167-172.
- TANAKA Y., DATA E. S., HIROSE S., TANIGUCHI T., URITANI I. (1983). *Biochemical changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava roots*. Agric. Biol. Chem. 47; 693-700.
- TÁRRAGA S. (2006). *Una nueva glicosiltransferasa de inducción temprana frente a señales patogénicas, en tomate*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- TÁRRAGA S., LISÓN P., LÓPEZ-GRESA M. P., TORRES C., RODRIGO I., BELLÉS J. M., CONEJERO V. (2010). *Molecular cloning and characterization of a novel tomato xylosyltransferase specific for gentisic acid*. J. Exp. Bot. 61(15): 4325-4338.
- TEUTSCH H. G., HASENFRATZ M. P., LESOT A., STOLTZ C., GARNIER J. M., JELTSCH J. M., DURST F., WERCKREICHHART D. (1993). *Isolation and Sequence of a Cdna-Encoding the Jerusalem-Artichoke Cinnamate 4-Hydroxylase, a Major Plant Cytochrome-P450 Involved in the General Phenylpropanoid Pathway*. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 4102-4106.
- THOMMA B. P., PENNINGCKX I. A., BROEKAERT W. F., CAMMUE B. P. (2001). *The complexity of disease signaling in Arabidopsis*. Curr. Opin. Immunol. 13: 63-68.
- TIMELL T. (1986). *Compression Wood in Gymnosperms*. Springer, Vol 1.
- TON J., MAUCH-MANI B. (2004). *Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is base don ABA-dependent priming for callose*. Plant J. 38: 119-130.
- TRUMAN W., DE ZABALA M. T., GRANT M. (2006). *Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance*. Plant J. 46: 14-33.
- UKNES D. et al. (1992). *Acquired resistance in Arabidopsis*. Plant Cell 4: 645-656.
- URITANI I. (1999). *Biochemistry on postharvest metabolism and deterioration of some tropical tuberous crops*. Bot. Bull. Acad. Sin. 40: 177-183.
- VAN DER BIEZEN E. A., JONES J. D. G. (1998). *Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept*. Trends Plant Sci. 23: 454-456.
- VAN DER HOORN R. A. L., KAMOUN S. (2008). *From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors*. The Plant Cell 20: 2009-2017.
- VENUGOPALA K. N., RASHMI V., ODHAV B. (2013). *Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity*. BioMed Research International. 2013: 1-14. DOI: 10.1155/2013/963248.

- VOGT T., JONES P. (2000). *Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family*. Trends Plant Sci. 5: 380-386.
- WALTON J. D. (1996). *Host-selective toxins: agents of compatibility*. Plant Cell 8: 1723-1733.
- WANG D., PAJEROWSKA-MUKHTAR K., CULLER A. H., DONG X. (2007). *Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway*. Curr. Biol. 17: 1784-1790.
- WARNECKE D. C., HEINZ E. (1994). *Purification of a Membrane-Bound UDP-Glucose:Sterol [beta]-D-Glucosyltransferase Based on Its Solubility in Diethyl Ether*. Plant Physiol. 105(4): 1067-1073.
- WERNER C., MATILE P. (1985). *Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barley mesophyll protoplasts*. J. Plant Physiol. 118: 237-249.
- WHITE F. F., YANG B., JOHNSON L. B. (2000). *Prospects for understanding avirulence gene function*. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 291-298.
- XU Z. J., NAKAJIMA M., SUZUKI Y., YAMAGUCHI I. (2002). *Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings*. Plant Physiology 129(3): 1285-1295. DOI: 10.1104/pp.001784.
- YALPANI N., LEÓN J., LAWTON M., RASKIN I. (1993). *Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco*. Plant Physiology 103: 315-321.
- YANG S., YOUNG SHIM G., KIM B., AHN J. (2015). *Biological synthesis of coumarins in Escherichia coli*. Microbial Cell Factories 14: 65. DOI: 10.1186/s12934-015-0248-y.
- ZHANG G. Z., JIN S. H., JIANG X. Y., DONG R. R., LI P., LI Y. J., HOU B. K. (2016). *Ectopic expression of UGT75D1, a glycosyltransferase preferring indole-3-butyric acid, modulates cotyledon development and stress tolerance in seed germination of Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Bio. 90: 77-93.
- ZHU L., NANG C., LUO F., PAN H., ZHANG K., LIU J., ZHOU R., GAO J., CHANG X., HE H., QIU Y., WANG J., LONG H., LIU Y., YAN T. (2016). *Esculetin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammatory processes and depressive-like behavior in mice*. Physiology & Behavior 163: 184-192.